



FACULTADE DE CIENCIAS

GRAO EN BIOQUÍMICA

D. Yago Somoza García-Losa

**Mutagénesis de genes pertenecientes al resistoma
secundario de *E. coli* resistente a cefotaxima**

Traballo Fin de Grao

Junio 2025

Licencia

Esa obra pertenece a Yago Somoza García-Losa está sujeta a la licencia Reconocimiento Compartir Igual 4.0 Internacional de Creative Commons. Para ver una copia de esta licencia, visite <https://creativecommons.org/licenses/by-sa/4.0/>



Índice

Resumen gráfico	4
Resumen	5
Resumo	6
Abstract	7
Abreviaturas	8
1. Introducción	10
1.1. Infecciones bacterianas resistentes	10
1.1.1. Antibióticos y su resistencia	10
1.1.2. Dispersión de la resistencia y mecanismos de acción	11
1.1.3. Resistoma secundario.....	12
1.1.4. Antibióticos β -lactámicos.....	12
1.1.4.1. Cefalosporinas	13
1.1.4.2. β -lactamasas	13
1.2. <i>Escherichia coli</i> y grupos clonales de interés	14
1.3. Transposon Directed Insertion-site Sequencing (TraDIS)	16
1.3.1. Resistoma secundario a CTX en <i>Escherichia coli</i>	17
1.3.1.1. El gen <i>ybeD</i> en <i>Escherichia coli</i>	17
2. Objetivos e hipótesis.....	19
3. Métodos	20
3.1. Cepas de <i>Escherichia coli</i> , plásmidos utilizados y crecimiento de las cepas	20
3.2. Caracterización de las cepas.....	20
3.3. Estudio de resistencias.....	22
3.4. Mutagénesis Lambda Red.....	25
3.4.1. Extracción de plásmidos	25
3.4.2. Preparación del fragmento.....	25
3.4.3. Células competentes y electroporación de pKD46	27

3.4.4. Células competentes para mutagénesis vía Lambda Red y electroporación del fragmento.....	28
3.4.5. Confirmación de la delección del gen <i>ybeD</i> por PCR.....	29
3.5. Determinación de la concentración mínima inhibitoria (MIC) de cefotaxima	30
3.6. Ensayo de cinética de muerte bacteriana (<i>time kill assay</i>).....	31
4. Resultados y discusión	33
4.1. Caracterización fenotípica de resistencias mediante antibiogramas	33
4.2. Caracterización genotípica de virulencia y resistencia mediante PCR.....	35
4.3. Obtención de la cepa mutante <i>Escherichia coli</i> $\Delta ybeD$	36
4.4. MICs de cefotaxima en las cepas salvajes y mutantes	37
4.5. <i>Time kill assay</i> empleando las cepas salvajes y mutantes	38
5. Conclusiones y perspectivas futuras	39
6. Anexos.....	41
6.1. Primers utilizados	41
7. Referencias.....	43

Resumen gráfico

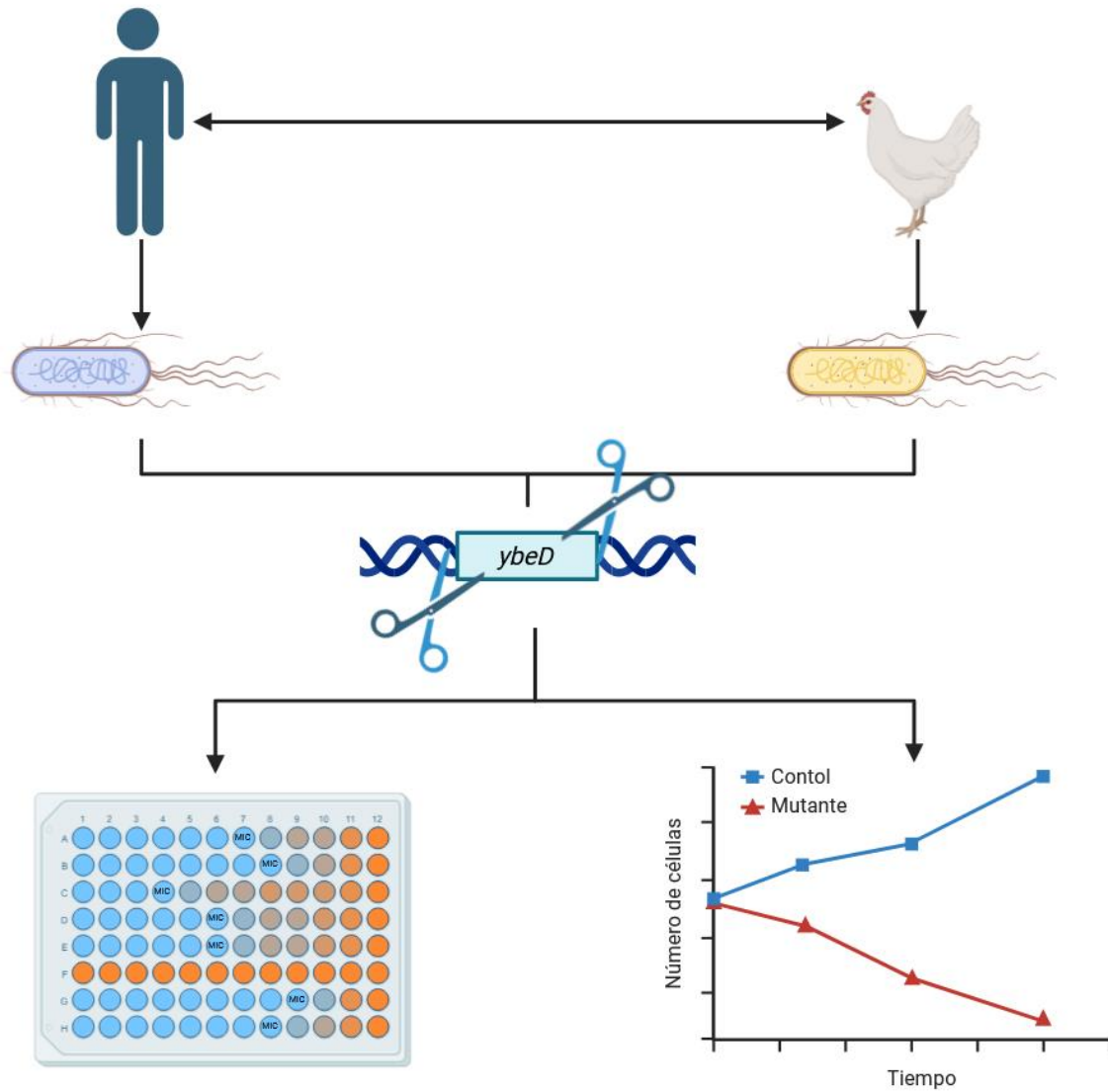


Figura 1. Resumen gráfico del trabajo. Elaborado con BioRender (<https://www.biorender.com>).

Resumen

Mutagénesis de genes pertenecientes al resistoma secundario de *E. coli* resistente a cefotaxima

La resistencia a agentes antimicrobianos en bacterias es uno de los principales problemas de salud a nivel mundial y se estima que debido a la difusión masiva de genes de resistencia entre cepas este problema aumente cada vez más.

Dentro de los patógenos considerados como críticos por la Organización Mundial de la Salud, frente a los que es urgente descubrir nuevas terapias, se encuentra *Escherichia coli* resistente a cefalosporinas de 3ª generación, como la cefotaxima (CTX); resistencia que puede deberse a la producción de β -lactamasas de espectro extendido.

El presente estudio tiene como objetivo comprobar el efecto sobre la resistencia a cefotaxima de un gen perteneciente al resistoma secundario frente a este antimicrobiano en cepas clínicas de *Escherichia coli* productoras de la enzima CTX-M-1.

Para ello, se llevó a cabo la mutagénesis del gen *ybeD* en dos cepas clínicas de *Escherichia coli* *bla*_{CTX-M-1} positivas, de origen humano y animal. Posteriormente se determinó la concentración mínima inhibitoria (MIC) de CTX en cada cepa, tanto salvajes como mutantes; mostrando una reducción en la MIC para los mutantes en comparación con la cepa salvaje correspondiente. Además, se realizó un ensayo de cinética de muerte bacteriana de 0 a 24 horas, empleando todas las cepas en estudio y creciéndolas en un medio suplementado con CTX—aproximadamente $\frac{1}{2}$ de la MIC en las cepas salvajes. En este ensayo se observó una reducción inicial en el crecimiento y supervivencia de cada cepa mutante respecto a la salvaje, y una recuperación a las 24 horas.

En conclusión, los resultados sugieren que el gen *ybeD* está involucrado en la resistencia a cefotaxima, ya que su delección reduce la resistencia a dicho antibiótico. Es importante destacar que la reducción es menor que la obtenida previamente en una cepa de referencia de *E. coli* portadora del gen *bla*_{CTX-M-1}.

Palabras clave: resistencia a antibióticos, *Escherichia coli*, resistoma secundario, cefotaxima, mutagénesis, *ybeD*, β -lactamasas de espectro extendido.

Resumo

Mutaxénese de xenes pertencentes ao resistoma secundario de *E. coli* resistente a cefotaxima

A resistencia a axentes antimicrobianos en bacterias é un dos principais problemas de saúde a nivel mundial e estímase que debido á difusión masiva de xenes de resistencia entre cepas este problema aumente cada vez máis.

Dentro dos patóxenos considerados como críticos pola Organización Mundial da Saúde, fronte aos que é urxente descubrir novas terapias, atópase *Escherichia coli* resistente a cefalosporinas de 3ª xeración, como a cefotaxima (CTX); resistencia que se pode deber á produción de β -lactamasas de espectro estendido.

O presente estudo ten coma obxectivo comprobar o efecto sobre a resistencia a cefotaxima dun xene pertencente ao resistoma secundario fronte a este antimicrobiano en cepas clínicas de *Escherichia coli* produtoras da enzima CTX-M-1.

Para iso, levouse a cabo a mutaxénese do xene *ybeD* en dúas cepas clínicas de *Escherichia coli* *bla*_{CTX-M-1} positivas, de orixe humana e animal. Posteriormente determinouse a concentración mínima inhibitoria (MIC) de CTX en cada cepa, tanto salvaxes coma mutantes; mostrando unha redución na MIC para os mutantes en comparación coa cepa salvaxe correspondente. Ademais, realizouse un ensaio de cinética de morte bacteriana de 0 a 24 horas, empregando todas as cepas do estudo e crecéndoas nun medio suplementado con CTX—aproximadamente $\frac{1}{2}$ da MIC nas cepas salvaxes. Neste ensaio observouse unha redución inicial no crecemento e supervivencia de cada cepa mutante respecto á salvaxe, e unha recuperación ás 24 horas.

En conclusión, os resultados suxiren que o xene *ybeD* está involucrado na resistencia a cefotaxima, xa que a súa deleción reduce a resistencia a dito antibiótico. É importante resaltar que a redución é menor que a obtida previamente nunha cepa de referencia de *E. coli* portadora do xene *bla*_{CTX-M-1}.

Palabras clave: resistencia a antibióticos, *Escherichia coli*, resistoma secundario, cefotaxima, mutaxénese, *ybeD*, β -lactamasas de espectro estendido.

Abstract

Secondary resistome gene mutagenesis on cefotaxime resistant *E. coli*

Antimicrobial resistance in bacteria is one of the main health issues worldwide and it is estimated that because of the massive diffusion of resistance genes among strains this problem is on the increase.

Among the pathogens considered critical by the World Health Organization, against whom new therapies are urgent, there is *Escherichia coli* resistant to 3rd generation cephalosporins, such as cefotaxime (CTX); resistance that can be due to the production of extended-spectrum β -lactamases.

The present study seeks to verify the effect on cefotaxime resistance of a gene belonging to the secondary resistome against this antimicrobial agent in two clinical strains of *Escherichia coli* that produce the CTX-M-1 enzyme.

To do this, the mutagenesis of the *ybeD* gene in both clinical strains, of human and animal origin, was carried out, and subsequently the minimum inhibitory concentration (MIC) towards CTX in each of the strains, both wild-type (WT) and mutants, was performed; observing a reduction on the MIC in each of the mutants with regards to the corresponding WT. Additionally, a time kill assay from 0 to 24 hours was performed in media supplemented with CTX—approximately $\frac{1}{2}$ of the MIC for the WT strains—using all the strains under study. Results showed that the mutant strains' growth and survival were initially impaired compared to the corresponding WT, and a recovery at 24 hours.

In conclusion, the results suggest that the *ybeD* gene is involved in the resistance to cefotaxime, since its deletion yielded a decrease in the MIC to such antibiotic. Notably, this reduction is lower than that previously obtained in a reference strain of *E. coli* carrying the *bla*_{CTX-M-1} gene.

Keywords: antibiotic resistance, *Escherichia coli*, secondary resistome, cefotaxime, mutagenesis, *ybeD*, extended-spectrum β -lactamases.

Abreviaturas

ADN	ácido desoxirribonucleico
APEC	del inglés, <i>avian pathogenic Escherichia coli</i>
CFU	del inglés, <i>colony forming unit</i>
CLSI	del inglés, <i>Clinical Laboratory and Standards Institute</i>
CTX	cefotaxima
DDST	del inglés, <i>double disk synergy test</i>
ESBL	del inglés, <i>extended-spectrum beta-lactamases</i>
EUCAST	del inglés, <i>European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing</i>
ExPEC	del inglés, <i>extraintestinal pathogenic Escherichia coli</i>
GM	gentamicina
HPI	del inglés, <i>high pathogenicity island</i>
InPEC	del inglés, <i>intestinal pathogenic Escherichia coli</i>
LA	Luria agar
LB	Luria broth
LREC	Laboratorio de Referencia de <i>Escherichia coli</i>
MDR	del inglés <i>multidrug-resistant</i>
MH	Mueller Hinton
MIC	del inglés, <i>minimum inhibitory concentration</i>
ML	MacConkey-lactosa
MNEC	del inglés, <i>meningitis-associated Escherichia coli</i>
OD	del inglés, <i>optical density</i>
ON	del inglés, <i>overnight</i>
PBP	del inglés, <i>penicillin-binding proteins</i>
PBS	del inglés, <i>phosphate-buffered saline</i>
PCR	del inglés, <i>polimerase chain reaction</i>

PDR	del inglés, <i>pandrug-resistant</i>
RT	del inglés, <i>room temperature</i>
SOB	del inglés, <i>super optimal broth</i>
SOC	SOB con glucosa 10 mM
TraDIS	del inglés, <i>transposon directed insertion-site sequencing</i>
TSB	del inglés, <i>triptone soy broth</i>
UPEC	del inglés, <i>uropathogenic Escherichia coli</i>
UTI	del inglés, <i>urinary tract infections</i>
UV	ultravioleta
WHO	del inglés, <i>World Health Organization</i>
XDR	del inglés, <i>extensively drug-resistant</i>

1. Introducción

1.1. Infecciones bacterianas resistentes

Las infecciones bacterianas resistentes son una de las principales causas de muerte del mundo, llegando a ser la resistencia a los antibióticos la causa directa de 1.27 millones de muertes a nivel global en el año 2019 (Murray *et al.*, 2022). Además, se estima que este problema aumente cada vez más debido a la dispersión masiva de genes de resistencia entre las poblaciones bacterianas, causada por el uso incorrecto y abusivo de antibióticos en animales, humanos y plantas, y llegue a suponer un coste social y financiero de 100 mil millones de dólares en 2050 (Pidcock, 2016), convirtiéndolo en una prioridad de salud pública que debe ser abordada con urgencia.

Los problemas derivados de las infecciones por bacterias resistentes se encuentran entre las tres primeras amenazas a la salud necesarias de respuesta y que requieren medidas de coordinación a nivel europeo (European Commission, 2022). Entre los patógenos considerados como prioridad crítica por la WHO (del inglés, *World Health Organization*) se encuentran *Acinetobacter baumannii* resistente a carbapenemes, *Enterobacterales* (*Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Enterobacter* spp., *Citrobacter* spp., *Proteus* spp., *Serratia* spp. y *Morganella* spp.) resistentes a carbapenemes y *Enterobacterales* resistentes a cefalosporinas de 3ª generación, como son cefotaxima, ceftriaxona o ceftazidima, entre otras (World Health Organization, 2024).

1.1.1. Antibióticos y su resistencia

Desde el descubrimiento de la penicilina por Alexander Fleming en 1928, los antibióticos han sido empleados constantemente para tratar exitosamente infecciones que, de no ser por su existencia, podrían llegar a ser letales. No mucho después del descubrimiento de la penicilina, se detectaron bacterias resistentes a esta, llegando a ser un problema clínico sustancial en la década de los 50. A partir de este momento se fueron descubriendo un gran número de antibióticos, con un desarrollo paralelo de resistencias hasta llegar al punto actual, en el que las resistencias se han extendido a prácticamente la totalidad de los antibióticos disponibles. Además, el desarrollo de nuevos antimicrobianos comerciales ha disminuido significativamente en las últimas décadas (Ventola, 2015).

El término “antibióticos” se refiere a aquellas sustancias, ya sean producidas de manera natural por algún organismo o diseñadas de manera semisintética, que detienen el

crecimiento de microorganismos, denominados bacteriostáticos; o los matan, conocidos como bactericidas (Upmanyu & Malviya, 2020). Originalmente, el término “antibiótico” se refería solo a aquellos compuestos de estas características producidos naturalmente por otro organismo, no incluyendo el término a los productos sintéticos, pero hoy en día, de manera general, ambos tipos son englobados bajo el término antibióticos o antimicrobianos, indiscriminadamente.

La resistencia antimicrobiana se puede definir como la presencia de genes en una bacteria, que codifiquen para mecanismos de resistencia que disminuyan o anulen el efecto del antibiótico, llevando así al aumento de la probabilidad de fracaso del tratamiento farmacológico (MacGowan & Macnaughton, 2017).

Las bacterias que poseen resistencias a varios tipos de antibióticos se pueden clasificar en tres grupos: bacterias MDR (del inglés *multidrug-resistant*), que son resistentes a al menos un compuesto en 3 o más categorías de antimicrobianos; bacterias XDR (del inglés, *extensively drug-resistant*), que son resistentes a, al menos, un agente en todas las categorías de antimicrobianos menos una o dos; y PDR (del inglés, *pandrug-resistant*), que son resistentes a, al menos, un agente de cada categoría de antibióticos (Magiorakos *et al.*, 2012).

1.1.2. Dispersión de la resistencia y mecanismos de acción

La resistencia a los antibióticos se puede dividir en dos tipos: intrínseca o adquirida. La resistencia intrínseca es aquella que es característica de todas las cepas de una misma especie sin necesitar alteración genética. Un ejemplo de elevada resistencia intrínseca es *Pseudomonas aeruginosa*, que presenta una permeabilidad de membrana reducida y expresa de manera natural una gran variedad de bombas de eflujo, así como β -lactamasas cromosómicas. La resistencia adquirida es la que sucede cuando bacterias que de forma natural serían susceptibles a la acción del antibiótico, obtienen genes que les otorgan mecanismos de resistencia frente a ese agente. La obtención de este tipo de resistencia puede ser por mutaciones (en promotores, partes de una proteína, etc.) o por transferencia genética horizontal, donde están involucrados elementos genéticos móviles como los plásmidos, transposones o integrones; y puede darse por conjugación (transferencia de plásmidos directa entre bacterias), transducción (transferencia de ADN mediante fagos) o transformación (captación de ADN del medio) (MacGowan & Macnaughton, 2017; Normark & Normark, 2002).

Existe una gran diversidad de mecanismos de acción de la resistencia a antimicrobianos, pero los principales se podrían resumir en: alteración de la diana del compuesto, por ejemplo, la modificación de proteínas de unión a penicilina (PBPs, del

inglés, *penicillin-binding proteins*) para que no puedan unirse los β -lactámicos; aumento del eflujo del compuesto fuera de la célula mediante bombas de eflujo, disminución de la permeabilidad al antibiótico, por ejemplo, mediante la pérdida de canales como las porinas, impidiendo así la entrada de β -lactámicos; y producción de enzimas inactivadoras como las enzimas modificadoras de aminoglucósidos, cloranfenicol acetil transferasas o β -lactamasas, que cambian la estructura del antibiótico para inhibir su acción sobre la bacteria (MacGowan & Macnaughton, 2017).

1.1.3. Resistoma secundario

El término “resistoma” se refiere a la totalidad de los genes de resistencia a antibióticos presentes tanto en bacterias patógenas como en aquellas que son productoras de antibióticos y las no patógenas ambientales. En el resistoma también se incluyen genes que, poseyendo un nivel bajo de resistencia o funciones bajas de unión a antibióticos, pueden evolucionar a mecanismos de resistencia bajo presión selectiva (Wright, 2007).

El resistoma secundario es un concepto novedoso que hace referencia a aquellos genes no esenciales para el crecimiento de una bacteria pero que, en presencia de concentraciones sub-inhedoras—y posiblemente terapéuticas—de antibiótico frente al que la bacteria presenta resistencia, su ausencia hace que el agente antimicrobiano recupere su efecto, o parte de él (Jana *et al.*, 2017). Las proteínas codificadas por los genes del resistoma secundario a un antibiótico en particular podrían representar dianas de nuevos compuestos adyuvantes de dicho antimicrobiano (Alobaidallah *et al.*, 2023; Wellner *et al.*, 2024).

1.1.4. Antibióticos β -lactámicos

Los antibióticos se dividen en varias familias entre las que cabe destacar la de los β -lactámicos, pues son unos de los tipos de antibióticos más empleados del mundo, sino directamente los más usados. Son ampliamente recetados debido a su buena tolerancia por parte del paciente, pues su mayor toxicidad son respuestas alérgicas en un pequeño porcentaje de los individuos tratados, y a su elevada eficacia. Su mecanismo de acción consiste en la inhibición de la síntesis de la pared bacteriana mediante la unión a PBPs, enzimas esenciales en la formación de los puentes cruzados de peptidoglucano en bacterias Gram-positivas y Gram-negativas. Los β -lactámicos se clasifican en varios grupos, entre los que se encuentran las penicilinas, cefalosporinas, carbapenemes y β -lactámicos monocíclicos, entre otros. Entre los años 2004 y 2014 casi la mitad de las prescripciones de β -lactámicos fueron cefalosporinas (Bush & Bradford, 2016).

1.1.4.1. Cefalosporinas

Las cefalosporinas son un grupo de β -lactámicos similar en su estructura y mecanismo de acción al de las penicilinas. La primera cefalosporina, la cefalosporina C, fue aislada de extractos crudos de hongos *Cephalosporium* y, desde su aparición, se diseñaron muchos derivados semisintéticos para modular el espectro de acción, la biodisponibilidad, la seguridad y las propiedades farmacológicas de estos antibióticos. Hoy en día, las cefalosporinas se clasifican en generaciones en función de su espectro de cobertura frente a bacterias Gram-positivas y Gram-negativas: las cefalosporinas de primera generación (por ejemplo, la cefazolina) son bastante eficaces frente a Gram-positivas y están más limitadas a la hora de actuar contra Gram-negativas, las de segunda (como la cefuroxima) y tercera generación (como la cefotaxima) mejoran considerablemente su eficacia contra bacterias Gram-negativas y, por último, cuarta (por ejemplo, cefepima) y quinta generación (como la ceftarolina) tienen una cobertura mejorada contra bacterias resistentes a las generaciones previas (De Rosa & Marabotti, 2021).

1.1.4.2. β -lactamasas

La producción de β -lactamasas es el mecanismo más importante de resistencia a los β -lactámicos en las bacterias Gram-negativas. Estas enzimas se encargan de hidrolizar el anillo β -lactámico de los antibióticos, de manera que inactivan su unión a las PBPs. Estas enzimas se pueden clasificar siguiendo dos criterios diferentes: en base a la similitud de su secuencia aminoacídica—sistema de clasificación Ambler con clases de la A a la D—o en base a el perfil de sustratos e inhibidores—clasificación Bush-Jacoby-Medeiros con grupos del 1 al 4. En la clasificación Ambler, las β -lactamasas de las clases A, C y D son serina β -lactamasas, mientras que las de la clase B son metalo- β -lactamasas. La resistencia a antibióticos mediada por estas enzimas, aunque puede ser cromosómica, es común que sea plasmídica, de manera que da lugar a una más fácil dispersión de las resistencias. Dentro de las β -lactamasas se destacan 3 tipos fundamentales de elevado interés (Babic *et al.*, 2006).

Las β -lactamasas AmpC pertenecen a la clase C de Ambler y al grupo 1 de Bush, son enzimas que hidrolizan penicilinas y cefalosporinas de hasta 3ª generación, son resistentes a inhibidores de β -lactamasas como el ácido clavulánico y también resistentes a cefoxitina, lo que permite distinguir un fenotipo AmpC de otro tipo de β -lactamasas (Babic *et al.*, 2006).

Las β -lactamasas de espectro extendido (ESBL, del inglés *extended-spectrum beta-lactamases*) son aquellas enzimas que confieren resistencia a penicilinas,

cefalosporinas de hasta la 3^a generación y aztreonam, y que sí son inhibidas por los inhibidores de β -lactamasas como el ácido clavulánico. Estas proteínas incluyen a los grupos 2be y 2d de Bush o, según la clasificación de Ambler, están integradas en las clases A y D. Se cree que se originaron a partir de mutaciones puntuales de β -lactamasas TEM y SHV, por lo que las ESBL incluyen estos dos tipos de enzimas, así como las metalo- β -lactamasas OXA, predominantes sobre todo en *Pseudomonas aeruginosa*. Aun así, dentro de las β -lactamasas de espectro extendido, la variante más común son las enzimas CTX-M, de las que se han encontrado más de 172 variantes genéticas y se dividen en cinco clústeres: CTX-M-1, -2, -8, -9 y -25. (Babic *et al.*, 2006; Paterson & Bonomo, 2005; Ramadan *et al.*, 2019).

Por último, las carbapenemasas son β -lactamasas especialmente preocupantes ya que tienen actividad contra prácticamente todos los antibióticos β -lactámicos, incluidos los carbapenemes, que son considerados medicamentos de último recurso. Este grupo de enzimas está compuesto fundamentalmente por serina-carbapenemasas, KPC-carbapenemasas, metalo- β -lactamasas y OXA carbapenemasas (Babic *et al.*, 2006).

1.2. *Escherichia coli* y grupos clonales de interés

Escherichia coli es un bacilo Gram-negativo que pertenece a la familia *Enterobacteriaceae*. Fue descrito por primera vez en 1885 por el pediatra alemán Theodor Escherich, de quien recibe su nombre (Escherich, 1885). Esta bacteria se encuentra de manera natural en el tracto gastrointestinal tanto de humanos como de animales, pero algunas cepas son patógenas y pueden causar un amplio abanico de enfermedades intestinales y extraintestinales, algunas de ellas potencialmente mortales (Mainil, 2013).

El método tradicional para identificar y clasificar cepas, tanto comensales como patógenas, de *E. coli* es comprobando los siguientes antígenos de superficie: polisacárido O-, antígeno flagelar H- y antígeno capsular K-; generando así el serotipo O:K:H, aunque muchos laboratorios carecen de la capacidad de serotipar el antígeno K, de manera que el estándar es utilizar el serotipo O:H, que sigue siendo muy diverso dado que hay alrededor de 186 grupos de antígeno O y 53 tipos de antígeno H (Fratamico *et al.*, 2016). Otros sistemas de clasificación se basan en la identificación de variantes en genes altamente conservados, lo que ha permitido clasificar a *E. coli* en 8 grupos filogenéticos (Clermont *et al.*, 2000, 2013, 2019) y secuencias tipo según el esquema MLST (Wirth *et al.*, 2006).

Independientemente de esta clasificación, las bacterias *E. coli* patógenas poseen ciertos atributos de virulencia que les permiten adaptarse a nuevos nichos y, por lo tanto, causar un amplio espectro de enfermedades. Las combinaciones más exitosas de factores de virulencia se han conservado para formar patotipos específicos. Generalmente, *Escherichia coli* patógena se divide en dos grupos: InPEC (del inglés, *intestinal pathogenic Escherichia coli*) y ExPEC (del inglés, *extraintestinal pathogenic Escherichia coli*). Dentro de ExPEC se diferencian tres clases principales: *E. coli* uropatógena (UPEC), asociada a meningitis/sepsis (MNEC), y patógena aviar (APEC) (Kaper *et al.*, 2004).

En el informe de la WHO (2024), *E. coli* es considerado un patógeno de importancia crítica cuando posee resistencias a cefalosporinas de 3ª generación o a carbapenemes. Este tipo de resistencias, como se comentó antes, se manifiestan habitualmente en forma de ESBL y otras β -lactamasas, que están ampliamente extendidas en diferentes clones de esta bacteria, destacando el clon que pertenece al grupo filogenético B2 y a la secuencia tipo ST131, asociado a septicemias e infecciones del tracto urinario (UTI, del inglés *urinary tract infections*) en humanos y, en la actualidad, disperso por todo el mundo. Este clon es considerado de alto riesgo y posee de manera habitual ESBL y carbapenemasas, siendo responsable de la diseminación de estas resistencias (Petty *et al.*, 2014; Vila *et al.*, 2016).

Aunque el grupo clonal ST131 es el más destacado por su combinación de virulencia y de resistencia a múltiples antibióticos, y por su prevalencia (Nicolas-Chanoine *et al.*, 2014), hay más clones de *E. coli* que tienen características genéticas y fenotípicas potencialmente interesantes que investigar y que no están tan estudiados. Algunos ejemplos de estos grupos clonales son los que pertenecen a las secuencias tipo ST58 y ST117.

ST58 es un grupo clonal pandémico asociado a ExPEC y perteneciente al filogrupo B1, característica interesante ya que prácticamente todas las cepas ExPEC forman parte del filogrupo B2, mientras que el B1 suele englobar cepas comensales. Este grupo clonal es una causa creciente de infecciones del torrente sanguíneo (bacteriemia) en todo el mundo, adquiridas normalmente después de consumir alimentos contaminados por la cepa, y también se ha identificado en ganado cárnico sano. Las cepas del grupo ST58 presentan, frecuentemente, resistencia a antibióticos mediante la producción de ESBL, además de transportar de manera habitual plásmidos ColV con factores de virulencia como Yersiniabactin HPI (del inglés, *high pathogenicity island*), que porta un sistema de captación de hierro, entre otros genes (Loncaric *et al.*, 2024; Reid *et al.*, 2022).

Por su parte, ST117 es un grupo clonal vinculado a ExPEC que pertenece al filogrupa G y también tiene presencia global. Se trata de un linaje de APEC emergente responsable de causar colibacilosis aviar, pero también relacionado con infecciones del tracto urinario, bacteriemia y neumonía en humanos. El grupo clonal se asocia frecuentemente con resistencia a antimicrobianos y plásmidos que portan dichos genes de resistencia, así como numerosos factores de virulencia (adhesinas fimbriales, sistemas de captación de hierro y alguna toxina) relacionados con patogenicidad. El grupo ST117 incluye bacterias zoonóticas, su principal foco de infección son las aves de corral, donde puede haber una selección favorable para las bacterias multirresistentes por el uso incorrecto de antibióticos en las explotaciones, por lo que las cepas asociadas se consideran una amenaza para la salud humana (Saidenberg *et al.*, 2024; Xia *et al.*, 2022).

1.3. Transposon Directed Insertion-site Sequencing (TraDIS)

TraDIS (del inglés, *transposon directed insertion-site sequencing*) es una técnica novedosa que consiste en la inserción aleatoria de un transposón a lo largo del genoma de una bacteria (de media más de 80 inserciones por gen, haciendo posible el mapeo de todos los genes presentes en el genoma del organismo). Las librerías transposómicas generadas en las bacterias de interés (librerías input) se ensayan en unas condiciones concretas de estudio. Tanto las librerías input como las librerías resultantes de este ensayo (librerías output) se secuencian para comprobar, mediante análisis bioinformático, el lugar de inserción del transposón. De esta manera, se pueden determinar los genes esenciales para la supervivencia de la bacteria bajo las condiciones de estudio, que serán aquellos en los que no ha habido ninguna, o pocas, inserciones del transposón que provoquen la inactivación del gen. En otras palabras, solo podrán crecer los mutantes de genes que no sean esenciales para sobrevivir en las condiciones estudiadas (Langridge *et al.*, 2009).

Esta técnica se ha utilizado para el estudio de genes esenciales en diferentes bacterias, como *Escherichia coli* o *Klebsiella pneumoniae*, bajo diferentes condiciones de crecimiento o supervivencia, por ejemplo, en condiciones específicas de infección que mimeticen la realidad *in vivo* (García *et al.*, 2021). Una posibilidad que investigar es el crecimiento de una bacteria, resistente a un antimicrobiano determinado, bajo estrés antibiótico para estudiar los genes pertenecientes al resistoma secundario del antimicrobiano frente al que la bacteria es resistente (Alobaidallah *et al.*, 2023, 2024; Jana *et al.*, 2017; Ma *et al.*, 2024; Wellner *et al.*, 2024).

1.3.1. Resistoma secundario a CTX en *Escherichia coli*

Alobaidallah *et al.* (2023) evaluaron los genes pertenecientes al resistoma secundario de cefotaxima (CTX), gentamicina (GM) y el tratamiento combinado de estos dos antibióticos, una de las combinaciones más comunes en la práctica clínica, en una cepa de *E. coli* de referencia resistente a CTX—resistencia inducida mediante conjugación con un plásmido portador de *bla*_{CTX-M-1}—usando TraDIS. Identificaron una batería de genes que pertenecían a cada uno de los resistomas secundarios mencionados.

Los autores seleccionaron algunos de estos genes y los mutaron en dicha cepa, además de evaluar el efecto de la delección sobre la MIC (del inglés, *minimum inhibitory concentration*) de CTX y otros antibióticos (cefalosporinas de diversas generaciones, GM y el tratamiento combinado de CTX y GM). Los genes cuya delección mostró un mayor efecto sobre la MIC de CTX (mayor reducción y, por lo tanto, mayor susceptibilidad) fueron *dnaK*, *ybeD*, *rsgA*, *cpxR* y *mnmA*.

1.3.1.1. El gen *ybeD* en *Escherichia coli*

El gen *ybeD* codifica para una proteína hipotética muy conservada, pequeña, de únicamente 87 aminoácidos, localizada en la región intergénica *dacA-lipB* y muy poco estudiada.

Se sabe que YbeD posee similitud de parte de su secuencia a los dominios ACT, que son dominios de unión a moléculas pequeñas y están involucrados en la regulación del metabolismo de aminoácidos y nucleósidos; además de presentar un dominio que puede indicar una función como regulador alostérico (Kozolov *et al.*, 2004). Por su localización y la presencia de estos dominios se cree que la proteína está involucrada en la regulación del metabolismo del ácido lipoico, también relacionado con el sistema de escisión de glicina, mediante la interacción con la proteína codificada por *lipB*.

LipB forma parte del metabolismo endógeno del ácido lipoico en *Escherichia coli* junto a LipA (Morris *et al.*, 1995). En otras bacterias Gram-negativas como son *Acinetobacter Baumannii* o *Pseudomonas aeruginosa*, el operón *lip* está relacionado con virulencia y adaptación al medio por captación de nutrientes, secretando LipB y LipA mediante el sistema de secreción tipo 2 (T2SS) (de Oliveira Silva *et al.*, 2025; L. T. Johnson *et al.*, 2016). Esta función vinculada a virulencia no está estudiada en *Escherichia coli*.

Por otro lado, se ha demostrado que la proteína YbeD está vinculada a choque térmico, mejorando el crecimiento de *Escherichia coli* a elevadas temperaturas, sobre todo a 46°C (Kim *et al.*, 2019).

Como se mencionó anteriormente, *ybeD* forma parte del resistoma secundario de CTX en *Escherichia coli* CTX-M-1 positiva dado que su delección produjo una reducción considerable de la MIC respecto a la cepa de salvaje, tanto frente a este antibiótico como a otros, incluyendo cefalosporinas de otras generaciones (Alobaidallah *et al.*, 2023). Esta reducción en la resistencia a los antibióticos ensayados se puede apreciar en la Tabla 1.

Tabla 1. Resultados de la MIC para la cepa de referencia y el mutante. Adaptada de (Alobaidallah *et al.*, 2023).

Cepa	CTX (mg/l)	GEN (mg/l)	CFZ (mg/l)	FOX (mg/l)	CAZ (mg/l)	FEP (mg/l)
MG1655 <i>bla</i> _{CTX-M-1}	256	1	1024	4-8	2	2
$\Delta ybeD$	16	0.25	512	2	0.25	0.5

2. Objetivos e hipótesis

El objetivo principal de este trabajo fue comprobar el efecto de la delección del gen *ybeD*, perteneciente al resistoma secundario a cefotaxima en *Escherichia coli*, sobre la reducción a la resistencia a cefotaxima en cepas clínicas de esta bacteria resistentes al antibiótico. Los subobjetivos del trabajo son los siguientes:

1. Caracterización de los perfiles de resistencia a antibióticos y de virulencia de las dos cepas clínicas CTX-M-1 positivas empleadas en este estudio.
2. Obtención de mutantes carentes de *ybeD* en cada una de las cepas clínicas.
3. Determinación de la concentración mínima inhibitoria de cefotaxima en todas las cepas de estudio: cepas salvajes y mutantes derivados.
4. Comprobación del crecimiento de las cepas salvajes y sus mutantes bajo estrés antibiótico (es decir, en presencia de CTX) mediante un ensayo de cinética de muerte bacteriana, o *time kill assay*. Evaluación del efecto de la delección durante el crecimiento.
5. Comparación de los resultados de este trabajo, en cepas clínicas, con los previamente publicados en una cepa de referencia y evaluación de la utilidad de replicar este tipo de estudio en cepas clínicas.

La hipótesis que se plantea para este estudio es que la ausencia del gen *ybeD* en las cepas clínicas de *Escherichia coli* CTX-M-1 positivas causará una reducción de la concentración mínima inhibitoria de cefotaxima—reducción de la resistencia—y afectará negativamente al crecimiento de la cepa en presencia de CTX.

3. Métodos

3.1. Cepas de *Escherichia coli*, plásmidos utilizados y crecimiento de las cepas

En este trabajo se utilizaron dos cepas clínicas de *Escherichia coli* CTX-M-1 positivas (portadoras del gen *bla*_{CTX-M-1}) para realizar los mutantes. La cepa denominada SB18101 es una *E. coli* aislada de los intestinos de un pollo en un matadero de Dinamarca en el año 2018 y pertenece al grupo clonal ST117 (Che *et al.*, 2023). La cepa denominada D66 es una *E. coli* aislada de una muestra de sangre humana en el Hospital Beaujon de París en el año 2015 y pertenece al grupo clonal ST58 (LREC, no publicado).

Estas cepas se conservaron a -20°C en una copia de congelador realizada con 500 µl de glicerol al 20% y 500 µl de medio LB con bacterias. También se realizó una copia de trabajo conservada en tubos Vacutainer con medio de conservación, formado por una mezcla de 11.5 g/l de Nutrient Agar (Applichem-Panreac) y 4 g/l Nutrient Broth (Applichem-Panreac). Bajo estas condiciones las cepas de *E. coli* mantienen su viabilidad durante al menos 10 años.

Los plásmidos empleados en este estudio fueron pKD46, con un cassette de resistencia a gentamicina, almacenado en una cepa *E. coli* DH5α (Doublet *et al.*, 2008); y pKD4, con un cassette de resistencia a kanamicina, almacenado en una cepa *E. coli* BW25113 (Datsenko & Wanner, 2000). Estas cepas fueron cedidas para este trabajo, por el grupo de investigación de Biología molecular de bacterias patógenas y estrategias antimicrobianas de la Universidad de Barcelona.

Para crecer las cepas se utilizaron diferentes medios como Luria Broth (Condalab) (LB) y LB Agar (Lennox) (Condalab) (LA) suplementados con antibióticos (ampicilina 100 µg/ml, gentamicina 20 µg/ml y/o kanamicina 50 µg/ml) cuando fuera pertinente, así como medios sin suplementación como MacConkey-lactosa (Oxoid) (ML), caldo de triptona-soja (Applichem-Panreac) (TSB), Mueller Hinton (Oxoid) (MH) y SOC (super optimal broth -SOB- (Condalab) con glucosa 20 mM).

3.2. Caracterización de las cepas

Se determinó si las cepas pertenecían a los estados ExPEC, APEC y UPEC, y se analizó la presencia de genes de producción de ESBLs, mediante la realización de PCRs para genes típicos asociados a estos estados (cebadores empleados en Anexos). En todas las reacciones se añadieron cepas control positivas cedidas por el Laboratorio de

Referencia de *Escherichia coli* (LREC) y un marcador de peso molecular (TIARIS™ Ruler 100-1000 bp, Tiaris).

El ADN bacteriano necesario para estas reacciones se extrajo suspendiendo una colonia aislada en un eppendorf con 500 µl de agua milliQ e incubándolo entre 5 y 10 minutos a una temperatura de entre 95 y 100°C en un termobloque (TS-100 Thermo Shaker, Biosan). Después, las muestras se centrifugaron a 11000 g durante 2 minutos. El ADN empleado en las reacciones de PCR se obtuvo del sobrenadante.

La mezcla de PCR se realizó teniendo en cuenta las siguientes proporciones para obtener un volumen final de 25 µl:

- 12.5 µl STOUT™ Green PCR Master Mix 2x (Tiaris)
- Entre 0.3 y 1 µl de primer forward (a partir de una solución 20 mM)
- Entre 0.3 y 1 µl de primer reverse (a partir de una solución 20 mM)
- x* µl de agua milliQ
- 5 µl de ADN

*la cantidad de agua dependerá del volumen añadido de primers, se completará para llegar a un volumen final de 25 µl.

Los primers y volúmenes empleados en las reacciones se incluyen en el apartado Anexos.

Las mezclas se sometieron a los siguientes ciclos en un termociclador (Gene Explorer, BIOER):

- 3 minutos a 94°C para una desnaturalización inicial
- 35 ciclos de 94°C (1 minuto) para la desnaturalización, x°C* (1 minuto) para la hibridación y 72°C (1 minuto 30 segundos) para la extensión
- 3 minutos finales de extensión a 72°C

La lectura de los productos amplificados se realizó mediante electroforesis en gel de agarosa (High-Q™ Agarose, Tiaris) convencional bajo luz UV (ultravioleta). El gel de agarosa se preparó al 1,5% en TAE 1x, preparado a partir de TAE50X (Bio-Rad) con la adición de 3µL de Green Safe Premium (NZYtech) por cada 100mL de TAE.

3.3. Estudio de resistencias

Para la determinación fenotípica de resistencias se realizaron antibiogramas incluyendo agentes representantes de diferentes grupos de antimicrobianos para determinar la susceptibilidad/resistencia a estos antibióticos.

Los antibiogramas se realizaron mediante la técnica de difusión en agar descrita por Barry & Thornsberry (1980). En primer lugar, se realizó una siembra por agotamiento en estrías de cada cepa en medio ML, incubándose las placas durante 18 horas a 37°C. Al día siguiente, se sembró una colonia aislada de cada cepa en un tubo con 5 ml de caldo TSB. La concentración bacteriana se ajustó a un valor de 0.5 en la escala de McFarland (aproximadamente $1.5 \cdot 10^8$ CFU/ml). La turbidez del tubo se comparó visualmente con el patrón de McFarland; en caso de no alcanzarse inmediatamente, se dejó incubar hasta llegar al valor deseado. Una vez ajustada la suspensión, se humedeció un hisopo estéril en ella y se realizó una siembra en césped sobre placas con medio MH agar. Las placas se dejaron reposar durante 5 minutos a temperatura ambiente antes de colocar los discos de antibióticos, asegurando una distancia mínima de 2.5 cm entre discos. En total se utilizaron tres placas por cada cepa ensayada.

Los antibióticos utilizados en este estudio se recogen en la Tabla 2.

Tabla 2. Antibióticos utilizados en cada placa para ver las resistencias.

	Antimicrobiano	Disco	Familia
Placa 1	Aztreonam	ATM30	Monobactámico (β -lactámico)
	Amoxicilina-Clavulánico	AMC30	Penicilina (β -lactámico)
	Ceftazidima	CAZ30	Cefalosporina 3ª generación (β -lactámico)
	Ampicilina	AM10	Penicilina (β -lactámico)
	Cefazolina	CZ30	Cefalosporina 1ª generación (β -lactámico)
	Cefuroxima	CXM30	Cefalosporina 2ª generación (β -lactámico)
Placa 2	Ceftriaxona	CRO30	Cefalosporina 3ª generación (β -lactámico)
	Imipenem	IMP10	Carbapenem (β -lactámico)
	Cefoxitina	FOX30	Cefalosporina 2ª generación (β -lactámico)
	Amikacina	AN30	Aminoglucósido
	Gentamicina	GM10	Aminoglucósido
Placa 3	Doxiciclina	D30	Tetraciclina
	Cloranfenicol	C30	Anfenicol
	Ac. Nalidíxico	NAL30	Fluoroquinolona
	Ciprofloxacina	CIP5	Fluoroquinolona
	Cotrimoxazol	SXT25	Sulfonamida
	Tetraciclina	TE30	Tetraciclina

La interpretación de los resultados se realizó siguiendo las guías publicadas por CLSI (del inglés, *Clinical Laboratory and Standards Institute*) (CLSI, 2025) y por EUCAST (del inglés, *European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing*) (EUCAST, 2025). Los criterios para confirmar resistencia, sensibilidad intermedia o sensibilidad se recogen en la Tabla 3.

Tabla 3. Valores del halo de inhibición (diámetro en mm) para interpretar los resultados de los antibiogramas. R=resistente, I=intermedia, S=sensible.

Disco	CLSI-2025			EUCAST-2025	
	S	I	R	S	R
ATM30	≥21	18-20	≤17	≥26	<21
AMC30	≥18	14-17	≤13	≥19	<19
CAZ30	≥21	18-20	≤17	-	-
AM10	≥17	14-16	≤13	≥14	<14
CZ30	≥23	20-22	≤19	≥50	<20
CXM30	≥23	15-22	≤14	≥19	<19
CRO30	≥23	20-22	≤19	≥27	<24
IMP10	≥ 23	20-22	≤ 19	≥22	<19
FOX30	≥ 18	15-17	≤ 14	≥19	<19
AN30	≥ 20	17-19	≤ 16	≥18	<18
GM10	≥ 18	15-17	≤ 14	≥17	<17
D30	≥14	11-13	≤10	-	-
C30	≥18	13-17	≤12	≥17	<17
NAL30	≥19	14-18	≤13	-	-
CIP5	≥26	22-25	≤21	≥25	<22
SXT25	≥16	11-15	≤10	≥14	<11
TE30	≥15	12-14	≤ 11	≥19	<19
CTX5	-	-	-	≥20	<17
FEP30	≥25	19-24	≤18	≥27	<24

Además, para cada cepa, se realizaron dos técnicas complementarias basadas en discos de antibióticos para detectar cepas productoras de β -lactamasas de espectro extendido (ESBL) y AmpC:

- i. La prueba de sinergia de doble disco (DDST) descrita por Jarlier *et al.* (1988). Para considerar un resultado como positivo para ESBL, debe observarse la formación de halos de inhibición con morfología en “corcho de botella”, caracterizados por un ensanchamiento del halo en dirección al disco central, que contiene ácido clavulánico (adyuvante). Este patrón indica sinergia entre el antibiótico β -lactámico y el inhibidor de β -lactamasas.
- ii. La prueba de discos combinados con inhibidor descrita por Navarro *et al.* (2011). Para considerar un resultado positivo para ESBL, el halo de inhibición en presencia de ácido clavulánico debe ser mayor de 5 mm comparado con el

resultado para el mismo antibiótico en ausencia de adyuvante. Un resultado sería positivo para AmpC si la cepa presentara resistencia a cefoxitina (FOX).

Los antibióticos usados se listan en la Tabla 4, y la disposición de los discos se puede observar en la Figura 2.

Tabla 4. Discos de antibióticos usados en la placa DDST (placa 1) y en la placa de la prueba de discos combinados con inhibidor.

	Antimicrobiano	Disco	Familia
Placa 1	Amoxicilina-Clavulánico	AMC30	Penicilina (β-lactámico)
	Cefotaxima	CTX5	Cefalosporina 3ª generación (β-lactámico)
	Ceftazidima	CAZ30	Cefalosporina 3ª generación (β-lactámico)
	Aztreonam	ATM30	Monobactámico (β-lactámico)
	Cefepima	FEP30	Cefalosporina 4ª generación (β-lactámico)
Placa 2	Cefotaxima	CTX5	Cefalosporina 3ª generación (β-lactámico)
	Ceftazidima	CAZ30	Cefalosporina 3ª generación (β-lactámico)
	Cefotaxima-Clavulánico	CTX + CLA	Cefalosporina 3ª generación (β-lactámico)
	Ceftazidima-Clavulánico	CAZ + CLA	Cefalosporina 3ª generación (β-lactámico)
	Cefoxitina	FOX30	Cefalosporina 2ª generación (β-lactámico)

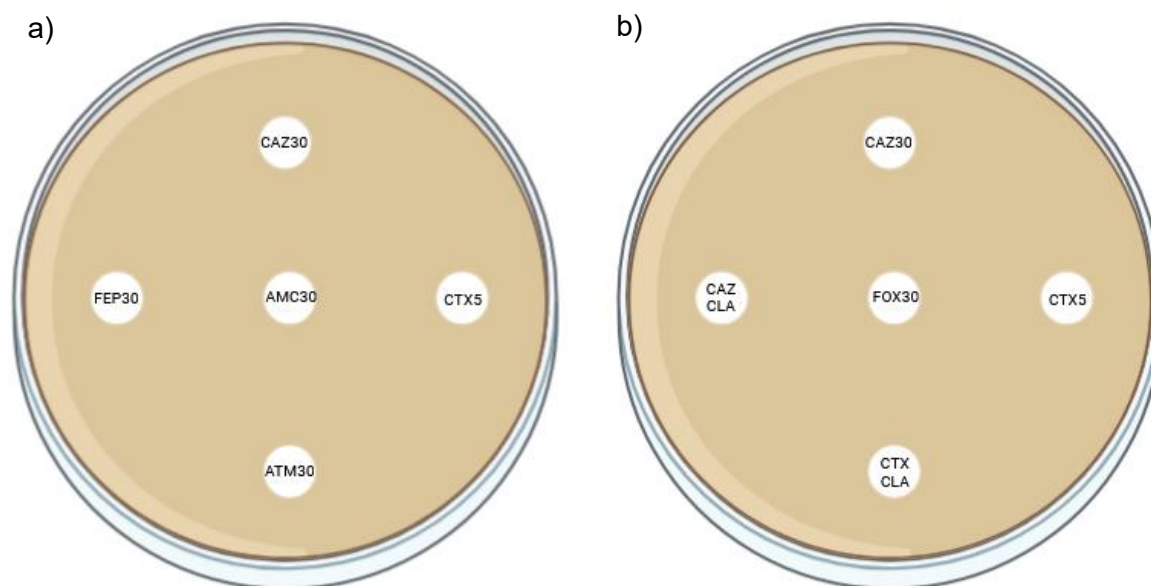


Figura 2. a) Disposición de los discos en la placa DDST. b) Disposición de los discos en la placa de la prueba de discos combinados con inhibidor.

3.4. Mutagénesis Lambda Red

La mutagénesis se realizó siguiendo, con ciertas modificaciones y optimizaciones, el protocolo descrito por Datsenko & Wanner (2000).

3.4.1. Extracción de plásmidos

Para llevar a cabo la mutagénesis es necesario, inicialmente, extraer los plásmidos que se van a utilizar a lo largo del protocolo. Para ello, se cultivó durante la noche (ON) la cepa que contenía pKD46 en un medio con gentamicina a una concentración de 20 µg/ml y la cepa que contenía pKD4 en un medio con kanamicina a una concentración de 50 µg/ml. El ADN plasmídico se extrajo a partir de 5 ml de cada cultivo siguiendo las instrucciones del kit comercial para extracción de plásmidos NucleoSpin® Plasmid (Macherey-Nagel).

A continuación, se midió la concentración de ADN plasmídico y su calidad empleando un NanoDrop® ND-1000.

3.4.2. Preparación del fragmento

El plásmido pKD4 posee unas secuencias conservadas en ambos extremos del cassette de resistencia a kanamicina llamados “priming sites” que se emplean para diseñar unos primers específicos a partir de la siguiente fórmula:

-Primer forward: 50 pares de bases homólogas a la secuencia del gen justo aguas arriba del codón de inicio, pudiendo incluir hasta las primeras 9 bp del inicio del gen manteniendo el marco de lectura + priming site 1 del plásmido pKD4.

-Primer reverse: 50 pares de bases homólogas a la secuencia del gen justo aguas abajo del codón stop + priming site 2 del plásmido pKD4.

Los primers diseñados están incluidos en el apartado Anexos.

Empleando estos primers y el ADN plasmídico correspondiente a pKD4 como plantilla, se realizó una PCR para obtener un fragmento que incluyera el gen de resistencia a kanamicina y los extremos homólogos a la región del gen.

La mezcla de la PCR se realizó de la siguiente manera, llegando a un volumen final de 25 µl (x4, en total 100 µl):

-0.5 µl polimerasa “proofreading” (Tiaris™ High-Fidelity, Tiaris)

-5 µl PCR buffer 5X (Tiaris)

-2 µl primer forward de mutagénesis (a partir de una solución 10 mM)

- 2 µl primer reverse de mutagénesis (a partir de una solución 10 mM)
- 10.5 µl agua (HyPure™ Molecular Biology Grade Water, Cytiva)
- 5 µl ADN plasmídico de pKD4

Esta mezcla se sometió a los siguientes ciclos en un termociclador (Gene Explorer, BIOER):

- 3 minutos a 94°C para una desnaturalización inicial
- 30 ciclos de 94°C (30 segundos) para la desnaturalización, 58°C (30 segundos) para la hibridación y 72°C (1 minuto 30 segundos) para la extensión
- 10 minutos finales de extensión a 72°C

Las muestras amplificadas se analizaron en un gel de agarosa al 0.8% (100 ml) elaborado como se describió previamente. El ladder que se utilizó fue NZYDNA Ladder VII (NZYtech).

Se obtuvo una muestra final de la PCR mezclando el contenido de las 4 muestras amplificadas en un mismo eppendorf, que se digirió con la enzima de restricción DpnI para eliminar posible ADN metilado siguiendo las indicaciones del fabricante.

A continuación, la muestra final se purificó siguiendo los últimos pasos del kit NucleoSpin® Plasmid EasyPure (Macherey-Nagel), en un volumen final de 90 µl. A esta solución se añadió un volumen de 10 µl de agua milliQ estéril para obtener un total de 100 µl, 300 µl de etanol 70% y 10 µl de acetato de sodio. La suspensión se almacenó durante una noche a -20°C para precipitar el ADN.

Al día siguiente se concentró el fragmento purificado. Para ello, se realizaron centrifugaciones de 45 minutos a 4°C, se descartó el sobrenadante y se repitieron 3 veces los siguientes pasos:

- Adición de 700 µl de etanol al 70% almacenado a -20°C
- Centrifugación durante 5 minutos a máximas revoluciones a 4°C
- Descarte del sobrenadante

Finalmente se secó el pellet dejando los eppendorf en la cabina de flujo laminar con la tapa abierta durante 30 minutos. A continuación, el pellet se resuspendió en 20 µl de agua milliQ estéril y se midió la concentración y calidad del ADN empleando un NanoDrop® ND-1000.

3.4.3. Células competentes y electroporación de pKD46

Para realizar la mutagénesis es necesario que el plásmido pKD46 esté presente en las cepas donde se pretende delecionar el gen, dado que porta maquinaria enzimática necesaria para la recombinación homóloga que promueve la mutagénesis del gen de interés. Esta batería de proteínas en pKD46 está formada por Gam, Bet y Exo, que se encargan de la recombinación. Mientras que Gam inhibe la endonucleasa RecBCD V del hospedador, encargada de degradar los ADN lineales en la bacteria, Bet y Exo acceden al ADN y promueven la recombinación del fragmento en la posición del gen que interesa eliminar, provocando su delección del genoma.

El plásmido pKD46 se extrajo siguiendo el protocolo mencionado para la extracción de pKD4.

Para preparar células competentes, se sembraron, y cultivaron a 37°C, las dos cepas clínicas de estudio en placas de LA suplementadas con ampicilina, empleado como antibiótico de selección. Tras el crecimiento ON, se recuperaron colonias aisladas que se suspendieron en 3 ml de medio LB con ampicilina y se dejaron crecer ON a 37°C. Al día siguiente se trasvasaron entre 1 y 2 ml de esa suspensión a un matraz con 100 ml de medio LB precalentado a 37°C con ampicilina (un matraz por cepa) y se dejaron crecer en agitación a 37°C hasta alcanzar una densidad óptica (OD, del inglés, *optical density*) de 0.6, medida con un espectrofotómetro (Novaspec pro, Biochrom).

Una vez se llegó a esa OD, se transfirió el volumen de cada matraz a dos tubos de centrifuga estériles seguido de incubación en hielo durante 15 minutos. A partir de este momento y hasta electroporar, todos los pasos se realizaron en frío. Tras la incubación, se centrifugó a 7000 g durante 10 minutos manteniendo una temperatura de entre 1°C y 4°C. A continuación, se descartó el sobrenadante y se resuspendió el pellet en 50 ml de agua milliQ estéril fría mantenida en hielo. Se repitió la centrifugación en las mismas condiciones, se descartó el sobrenadante y se resuspendió el pellet en 25 ml de agua milliQ estéril fría. Se repitió la centrifugación y, después de descartar el sobrenadante, se resuspendió el pellet en 2 ml de glicerol al 10% frío. Se centrifugó por última vez, se descartó el sobrenadante y se resuspendió el pellet en 200 µl de glicerol al 10% frío. Esta solución se dividió en alícuotas de 50 µl y algunas se congelaron a -80°C para su uso futuro.

Algunas alícuotas se mantuvieron en hielo y se les añadió 2 µl de ADN plasmídico de pKD46. La mezcla se añadió a una cubeta de electroporación de separación de 1 mm previamente enfriada en hielo. La electroporación se realizó en un electroporador (MicroPulser™, Bio-Rad) mediante un pulso del programa "bacteria EC 1" (25 µF; 200

Ω ; 1,8 kV) y, tras la electroporación, se recuperó el volumen de solución en la cubeta con una pipeta Pasteur, que se suspendió en 1 ml de medio SOC precalentado a 30°C.

Las suspensiones se incubaron a 30°C durante 1 hora en agitación y, a continuación, se sembraron volúmenes de entre 20 y 50 μ l en placas de LA con ampicilina y gentamicina, gen de resistencia presente en pKD46 (Doublet *et al.*, 2008).

Las colonias que crecieron, transformadas con pKD46, se prepararon para almacenamiento a -20°C y se realizó una copia de trabajo.

3.4.4. Células competentes para mutagénesis vía Lambda Red y electroporación del fragmento

Las cepas clínicas de estudio portadoras de pKD46 se cultivaron en placas de LA con gentamicina a 30°C para obtener colonias aisladas que se cultivaron posteriormente ON en LB con gentamicina a la misma temperatura en agitación. Al día siguiente se añadieron 500 μ l de los cultivos a matraces (uno por cepa) con 50 ml de medio LB con gentamicina precalentado a 30°C. Cada suspensión se dejó crecer hasta una densidad óptica de 0.3, cuando se añadieron 3 ml de una solución de L-arabinosa 1M. Se continuó el crecimiento hasta que la suspensión alcanzó una densidad óptica de 0.6, momento en el que se trasvasaron los 50 ml de muestra a un tubo de centrifuga estéril. Las densidades ópticas fueron medidas con un espectrofotómetro (Novaspec pro, Biochrom).

Los tubos se incubaron en hielo durante mínimo 10 minutos. Todos los pasos posteriores se realizaron en frío. Tras la incubación, se centrifugaron las suspensiones a 7000 g y entre 1°C y 4°C durante 10 minutos. Se descartó el sobrenadante y se resuspendió el pellet en 50 ml de agua milliQ estéril fría. Al terminar otra incubación de 10 minutos en hielo se volvió a centrifugar en las mismas condiciones, se descartó el sobrenadante y se resuspendió el pellet en 25 ml de agua milliQ estéril fría. Este ciclo de incubación, centrifugación y resuspendido del pellet se repitió otras 3 veces, empleando 2 ml de glicerol al 10% frío para resuspender el pellet las dos primeras veces y 200 μ l de glicerol al 10% frío tras la última centrifugación.

El volumen final obtenido se dividió en eppendorfs para conseguir alícuotas de 90 μ l. A cada alícuota se le añadió entre 500 y 1000 ng del fragmento purificado en pasos anteriores (el volumen a añadir varía en función de la concentración, pero suele ser entre 3 y 5 μ l), se mezcló la suspensión y se añadió la mezcla a una cubeta de electroporación de separación de 1 mm previamente incubada en hielo. Finalmente, se procedió a dar un pulso de electroporación empleando el programa “bacteria EC 1” (25

μF; 200 Ω; 1,8 kV) del electroporador (MicroPulser™, Bio-Rad). Como parte del protocolo, se empleó un control negativo en el que se añadió agua en vez de el fragmento purificado.

La solución se recuperó de la cubeta empleando una pipeta Pasteur y se añadió a 1 ml de SOC incubado a 37°C. La suspensión se dejó en agitación a 37°C durante 1 hora y 30 minutos. Una vez pasado este tiempo se centrifugó cada tubo a 5000 rpm durante 3 minutos a temperatura ambiente (RT, del inglés *room temperature*), descartando 950 μl del sobrenadante. El volumen sobrante de sobrenadante se utilizó para resuspender el pellet. La suspensión se sembró empleando esferas de cristal (*glass beads*) en placas de LA con ampicilina y kanamicina, que se dejaron crecer durante 48 horas, las primeras 24 horas a 37°C y las últimas a 40°C—el plásmido pKD46 es termosensible y se pierde a temperaturas por encima de 30°C.

3.4.5. Confirmación de la delección del gen *ybeD* por PCR

Para confirmar el reemplazo del gen de interés en el genoma por el fragmento purificado con el cassette de resistencia a kanamicina, es necesario hacer una PCR de verificación en las colonias que crecieron en las placas de LA suplementadas con ampicilina y kanamicina.

Esta PCR requiere el diseño de primers de verificación, que tienen que encontrarse a unas 150 pares de bases aguas arriba y aguas abajo del gen a eliminar y poseer temperaturas de anillamiento parecidas.

Los primers de verificación utilizados en este estudio están incluidos en el apartado Anexos.

Para la reacción de PCR usó como plantilla el ADN extraído de unas 7-8 colonias mediante el uso de calor (hervidillo), como se describió anteriormente, y se realizó una mezcla con las siguientes proporciones para conseguir un volumen final de 25 μl:

- 12.5 μl STOUT™ Green PCR Master Mix 2x (Tiaris)
- 1 μl primer forward de verificación (a partir de una solución 10 mM)
- 1 μl primer reverse de verificación (a partir de una solución 10 mM)
- 5.5 μl agua milliQ
- 5 μl ADN bacteriano

Esta mezcla se sometió a los siguientes ciclos en un termociclador (Gene Explorer, BIOER):

-3 minutos a 94°C para una desnaturalización inicial

-35 ciclos de 94°C (1 minuto) para la desnaturalización, x°C* (1 minuto) para la hibridación y 72°C (1 minuto 30 segundos) para la extensión

-3 minutos finales de extensión a 72°C

*esta temperatura depende de la temperatura de anillamiento de los primers.

Las muestras amplificadas se analizaron en un gel de agarosa al 1.5% (100 ml) preparado como se describió previamente. El ladder usado como marcador de peso molecular fue NZYDNA Ladder VII (NZYtech).

3.5. Determinación de la concentración mínima inhibitoria (MIC) de cefotaxima

Se determinó la concentración mínima inhibitoria del antibiótico CTX frente a las cepas en el estudio: las dos cepas clínicas y sus respectivos mutantes, carentes de *ybeD*.

Para ello se preparó una suspensión bacteriana en medio de cultivo MH con los antibióticos correspondientes, que se dejó crecer ON a 37°C. Al día siguiente se midió la densidad óptica de una dilución 1:10 de la suspensión para determinar la OD del cultivo original. Con estos datos se realizó una dilución a una OD final de 0.1 (1 ml) y, a partir de esta, una segunda dilución a una OD de 0.00065 (2 ml), equivalente a aproximadamente 10⁶ unidades formadoras de colonias (CFU, del inglés, *colony forming unit*)/ml. Esta será la solución de partida.

Para determinar con exactitud las CFU/ml en la suspensión de partida, se realizaron diluciones seriadas de orden 10, es decir trasvasando 0.1 ml de suspensión anterior a un nuevo tubo con 0.9 ml de PBS (del inglés, *phosphate-buffered saline*) (Corning), hasta llegar a la dilución 10⁻⁶. Se sembraron separadas 3 gotas de 10 µl de las diluciones 10⁻⁴, 10⁻⁵ y 10⁻⁶ en una placa de MH y se determinaron las CFU/ml.

Por otro lado, se preparó una solución madre de CTX a 50 mg/ml, a partir de la que se hizo una alícuota de trabajo en MH a 1024 µg/ml. La concentración más alta ensayada en la placa microtiter de 96 pocillos donde se realiza la MIC es de 512 µg/ml.

Para la realización de la MIC, se distribuyó en cada una de las columnas 2 a 11 de la placa microtiter un volumen de 50 µl de MH, en la columna 12 un volumen de 100 µl de este mismo medio como control negativo, y en la columna 1 un volumen de 100 µl de la solución de MH con CTX a 1024 µg/ml. Utilizando una pipeta multicanal se trasvasaron 50 µl de cada uno de los pocillos de esa columna a la siguiente, y así sucesivamente,

hasta llegar a la columna 10, donde después de mezclar los contenidos, se descartaron 50 µl de medio, dejando así las columnas 1 a 10 con diluciones seriadas 1:2 de CTX (de 512 a 1 µg/ml).

A continuación, se añadieron 50 µl de la suspensión de partida (OD de 0.00065) de cada cepa, a cada pocillo correspondiente, obteniendo un volumen final de 100 µl. Para terminar, se tapó la placa y se incubó a 37°C entre 20 y 24 horas.

La disposición de las cepas y de las concentraciones de antibiótico en la placa, se muestran en la Figura 3. La lectura de resultados se llevó a cabo visualmente, determinando la concentración más baja de CTX en la que no se percibía crecimiento bacteriano para cada una de las cepas, que es la MIC de CTX.

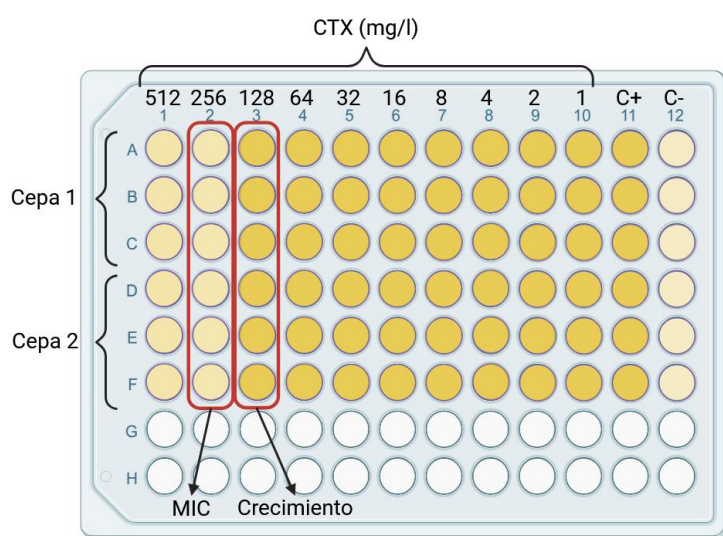


Figura 3. Contenido de cada uno de los pocillos (cepa y concentración de antibiótico) en la placa utilizada para realizar la MIC. Elaborado con BioRender (<https://www.biorender.com>).

3.6. Ensayo de cinética de muerte bacteriana (*time kill assay*)

Con el fin de comparar el crecimiento de las bacterias mutantes y salvajes, y analizar el efecto de la delección de *ybeD* en presencia de cefotaxima se realizó este ensayo como se detalla a continuación.

Partiendo de un cultivo crecido ON a 37°C de cada cepa salvaje y mutante, se prepararon diluciones con un volumen final de entre 5 y 10 ml en medio MH suplementado con una concentración de CTX de alrededor de la mitad de la MIC de la cepa salvaje en cuestión, y a una OD de 0.00065 para conseguir la suspensión de partida, que corresponde a, aproximadamente, 10^6 CFU/ml, como se citó anteriormente.

De cada suspensión de partida, se realizaron diluciones seriadas 1:10 en PBS, representado en la Figura 4, y se colocaron 2 gotas de 20 µl de las diluciones 10^{-3} , 10^{-4}

y 10^{-5} en placas de MH con el fin de determinar el número preciso de CFU/ml de cada cepa a tiempo 0. El recuento se realizó tras el crecimiento en las placas ON a 37°C .

Se dejaron crecer las suspensiones de partida (OD de 0.00065 y concentración de CTX de $256\ \mu\text{g/ml}$) a 37°C en agitación durante 24 horas, tomando muestras de $100\ \mu\text{l}$ a las 3, 6 y 24 horas; en cada uno de estos tiempos se realizaron diluciones seriadas como se comentó (Figura 4). Las diluciones sembradas fueron las de factor 0 a -5 para las cepas salvajes y mutantes (tiempo 3 h), las diluciones de factor entre 0 y -6 (cepas salvajes) y entre 0 y -4 (cepas mutantes) (tiempo 6 h), y las diluciones de factor -5 a -8 para las cepas salvajes y de 0 a -8 para las mutantes (tiempo 24 h).

Se obtuvieron curvas de crecimiento (usando BioRender) en las que se representó el logaritmo de las CFU/ml frente al tiempo.

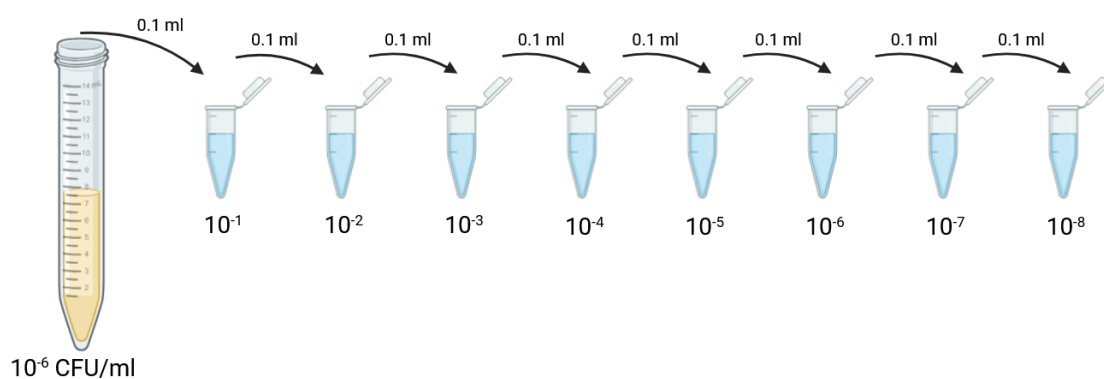


Figura 4. Esquema de cómo se realizaron las diluciones seriadas. Elaborado con BioRender (<https://www.biorender.com>).

4. Resultados y discusión

4.1. Caracterización fenotípica de resistencias mediante antibiogramas

Los resultados obtenidos tras la realización de los antibiogramas permitieron conocer el perfil de resistencia de las cepas de estudio salvajes (D66 y SB18101) frente a los antibióticos ensayados, además de permitir establecer y distinguir un fenotipo ESBL de uno AmpC gracias a las pruebas de DDST y discos combinados con inhibidor.

En la Tabla 5 se muestra el perfil de resistencia de las cepas frente al panel de antibióticos presentado en la Tabla 2.

Tabla 5. Perfiles de resistencia de las cepas de estudio basados en la realización de antibiogramas. R=resistente, I=intermedia, S=sensible.

Familia	Antimicrobiano	Resistencia			
		Cepa D66		Cepa SB18101	
		CLSI 2025	EUCAST 2025	CLSI 2025	EUCAST 2025
β-lactámicos	Aztreonam	R	R	S	I
	Amoxicilina-Clavu	I	R	S	S
	Ceftazidima	I	I	S	S
	Ampicilina	R	R	R	R
	Cefazolina	R	R	R	R
	Cefuroxima	R	R	R	R
	Ceftriaxona	R	R	R	R
	Imipenem	S	S	S	S
	Cefoxitina	S	S	S	S
Aminoglucósidos	Amikacina	I	S	S	S
	Gentamicina	S	S	S	S
Anfenicoles	Cloranfenicol	S	S	S	S
Fluoroquinolonas	Ac. Nalidíxico	S	S	S	S
	Ciprofloxacina	S	S	S	S
Sulfonamidas	Cotrimoxazol	S	S	I	S
Tetraciclinas	Tetraciclina	R	R	R	R
	Doxiciclina	R	R	R	R

Ambas cepas mostraron un perfil de resistencias similar, con una clara resistencia a antibióticos pertenecientes al grupo de los β-lactámicos, presentando un mayor espectro de resistencias la cepa D66 ampliado a aztreonam y amoxicilina-ácido clavulánico.

Los resultados sugieren que se trata de cepas productoras de β-lactamasas de espectro extendido (ESBL) y, en el caso de D66, la resistencia a la combinación amoxicilina-ácido clavulánico podría indicar una enzima AmpC; aunque también otros mecanismos accesorios como bombas de eflujo o sobreexpresión de ESBL.

Para confirmar el fenotipo ESBL/AmpC analizamos los resultados de los ensayos DDST y de discos combinados con inhibidor, que se pueden observar en la Figura 5.

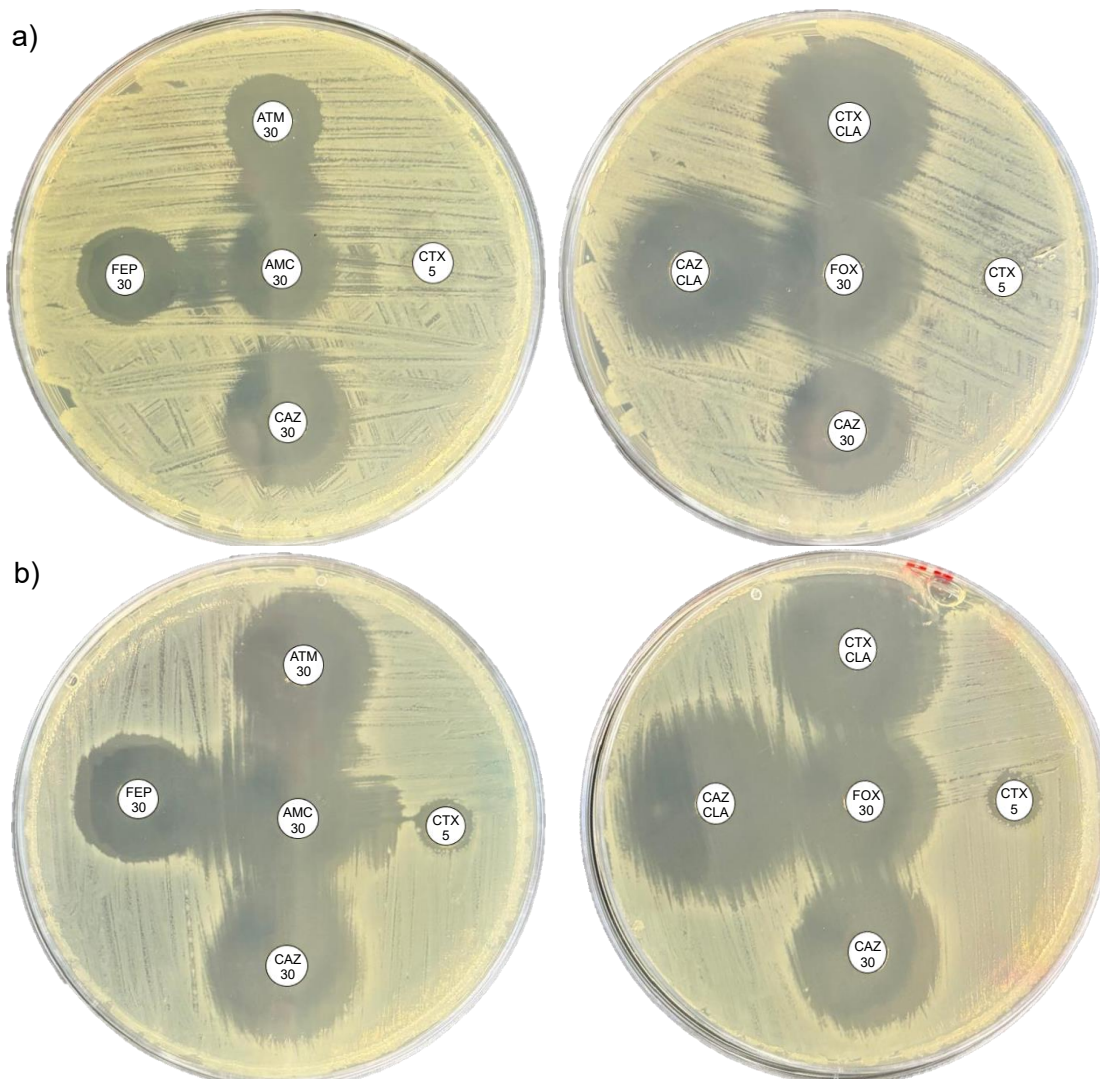


Figura 5. a) Resultados de los ensayos DDST (izquierda) y de discos combinados con inhibidor (derecha) en la cepa D66. b) Resultados de los mismos ensayos en la cepa SB18101.

En ambas cepas pudimos observar la forma característica de los halos en “corcho de botella” que se produce cuando hay sinergia en la placa del ensayo DDST por la presencia de ácido clavulánico en el disco central (AMC 30), que resensibiliza las cepas a la acción de los antibióticos β -lactámicos (aztreonam, cefotaxima, cefepima y ceftazidima) mediante la inhibición de las enzimas ESBL y que, por tanto, actúa como adyuvante con los antibióticos β -lactámicos ensayados.

De nuevo en ambas cepas observamos un aumento del halo de inhibición superior a 5 mm cuando comparamos el halo de inhibición entre un antibiótico perteneciente al grupo de los β -lactámicos solo (CTX 5 y CAZ 30) y con un inhibidor de β -lactamasas como es el ácido clavulánico (CTX CLA y CAZ CLA). Además, ambas cepas fueron sensibles a cefoxitina (FOX) lo que descarta la presencia de una enzima de tipo AmpC.

Además, estas dos pruebas confirmaron la resistencia de ambas cepas a dos antibióticos β -lactámicos: cefotaxima (CTX), frente a la que es interesante confirmar su resistencia por su importancia en este trabajo; y cefepima (CAZ), β -lactámico de 4^o generación, grupo sin representantes entre los antibióticos de la Tabla 2.

4.2. Caracterización genotípica de virulencia y resistencia mediante PCR

Para que una cepa pueda ser considerada presuntivamente como ExPEC debe poseer al menos dos de los siguientes marcadores genéticos: *PapEF* y/o *PapC*, *sfa/foc*, *afa/dra*, *iutA* y *kpsM II* (J. R. Johnson *et al.*, 2015). Para ser designada como UPEC debe presentar al menos tres de los siguientes genes: *chuA*, *fyuA*, *vat* y *yfcV* (Spurbeck *et al.*, 2012). En el caso de APEC, los marcadores serán cuatro de los siguientes genes: *hlyF*, *iutA*, *iroN*, *iss* y *ompT* (T. J. Johnson, Wannemuehler, Doetkott, *et al.*, 2008).

Los resultados del análisis de ambas cepas se muestran en la Tabla 6.

Tabla 6. Genes de virulencia asociados a los estatus ExPEC, UPEC y APEC, y de resistencia codificantes de enzimas ESBL en las cepas de estudio.

Genes	D66	SB18101
<i>bla</i> _{CTX-M} grupo 9	-	-
<i>bla</i> _{CTX-M} grupo 1	+	+
<i>bla</i> _{TEM}	+	-
<i>bla</i> _{SHV}	-	-
<i>papC</i>	-	-
<i>papEF</i>	-	-
<i>sfa/focDE</i>	-	-
<i>afa/draBC</i>	-	-
<i>yfcV</i>	-	-
<i>iutA</i>	+	+
<i>iroN</i>	+	+
<i>fyuA</i>	-	-
<i>iss</i>	+	+
<i>ompT</i>	+	+
<i>kpsM II</i>	-	-
<i>hlyF</i>	+	+
<i>vat</i>	+	+
<i>chuA</i>	-	+

De acuerdo con los genes que poseen, ambas cepas pertenecen al patotipo APEC, ambas producen una enzima *bla*_{CTX-M} del grupo 1 y la cepa D66 produce también una enzima *bla*_{TEM}.

En el caso de la cepa SB18101, los resultados—patotipo APEC—concuerdan con el origen de la cepa (pollo) y sugieren el potencial zoonótico de la cepa D66, de origen humano. Ambas poseen el gen *bla*_{CTX-M} grupo 1, lo que concuerda con los resultados de los antibiogramas y confirma los resultados previos obtenidos (Che *et al.*, 2023; LREC, datos no publicados).

4.3. Obtención de la cepa mutante *Escherichia coli* $\Delta ybeD$

Obtuvimos los dos mutantes carentes de *ybeD* a partir de la cepa salvaje correspondiente mediante mutagénesis basada en Lambda Red, como se describe en la sección de materiales y métodos. Seleccionamos 3 colonias potencialmente mutantes por cepa, las hicimos crecer a 40°C para asegurar la pérdida del plásmido pKD46—implicado en el proceso de recombinación homóloga—y las sometimos a una PCR de verificación para confirmar la delección del gen *ybeD*.

Como se puede comprobar en la Figura 6, los resultados de la PCR mostraron bandas de aproximadamente 2000 bp, lo que corresponde al tamaño del fragmento en caso de mutación: la longitud del fragmento amplificado esperado es 1953 bp; mientras el control positivo, formado por una mezcla de ambas cepas salvajes, resultó en una banda más pequeña que corresponde con el fragmento amplificado esperado si el gen está intacto (longitud de 744 bp).

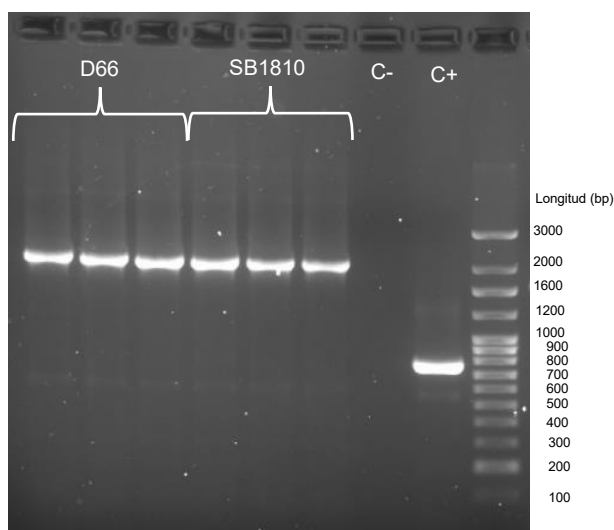


Figura 6. Gel de agarosa con los resultados de la PCR de confirmación. En los 3 primeros pocillos se cargaron los amplificados de las colonias de la cepa D66, en los 3 siguientes los de la cepa SB18101 y en los 3 últimos control negativo, control positivo y ladder, respectivamente.

Comprobamos la pérdida del plásmido pKD46 en las colonias mutantes, sembrándolas en placas de LA suplementadas con ampicilina y gentamicina. Como era de esperar, los mutantes no fueron capaces de crecer en presencia de gentamicina—resistencia que aportaba pKD46. Almacenamos las colonias mutantes confirmadas a -20°C en

crioviales; también realizamos una copia de trabajo, en medio de conservación suplementado con ampicilina, de una de las colonias mutantes de la cepa D66 y otra de la cepa SB18101.

4.4. MICs de cefotaxima en las cepas salvajes y mutantes

Para confirmar una reducción de la resistencia a CTX asociada a la delección del gen *ybeD*, como se había demostrado previamente en una cepa de *Escherichia coli* de referencia (Alobaidallah *et al.*, 2023), analizamos la MIC de CTX en las cepas salvajes y los mutantes correspondientes. Los resultados de las MICs realizadas se pueden observar en la Tabla 7.

Tabla 7. Valores obtenidos de las MICs de CTX para todas las cepas utilizadas en este trabajo.

Cepa	MIC de CTX (mg/l)
D66	>512
SB18101	512
D66 Δ <i>ybeD</i>	256
SB18101 Δ <i>ybeD</i>	256

Los resultados muestran que la MIC de CTX disminuyó en ambas cepas cuando se eliminó el gen *ybeD*, lo que confirma que forma parte del resistoma secundario de CTX en cepas clínicas de *E. coli* CTX-M-1 positivas, es decir, su ausencia redujo la resistencia a CTX conferida por CTX-M-1. Aun así, esta reducción no fue suficiente para resensibilizar las cepas a CTX, dado que, según los criterios de EUCAST (2025) y del CLSI (2025), una cepa de *E. coli* se considera sensible a CTX cuando su MIC es igual o menor que 1 mg/l.

Además, dicha reducción fue mucho menor—reducción de 2 veces—que la observada en la cepa de *E. coli* K12 resistente a CTX por conjugación de un plásmido portador del gen *bla*_{CTX-M-1} en el estudio mencionado, donde la MIC se redujo de 256 mg/l en la cepa salvaje a 16 mg/l—reducción de 16 veces—en el mutante Δ *ybeD*, mostrando que, en el caso de las cepas clínicas, el impacto de genes del resistoma secundario sobre la resistencia a CTX es muy diferente al observado en cepas de laboratorio.

Los resultados resaltan la relevancia de confirmar el papel de los genes en cepas clínicas, pues las cepas de referencia no reflejan necesariamente las condiciones ni el comportamiento de las bacterias causantes de infecciones en un entorno clínico real.

4.5. *Time kill assay* empleando las cepas salvajes y mutantes

Para analizar el efecto de la delección de *ybeD* sobre el crecimiento de las cepas en presencia de cefotaxima a una concentración de alrededor de la mitad de la MIC del antibiótico en las cepas salvajes, concretamente 256 mg/l, realizamos un ensayo de cinética de muerte bacteriana, o *time kill assay*. La Figura 7 muestra las curvas de crecimiento de cada cepa salvaje y su respectiva cepa mutante a lo largo de 24 horas.

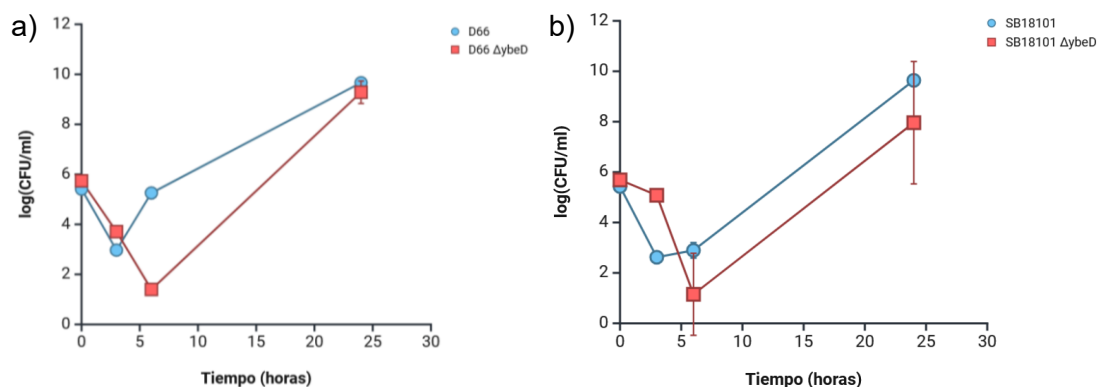


Figura 7. Gráficas que muestran el crecimiento de las cepas durante el ensayo, representando el logaritmo de las CFU/ml frente al tiempo de incubación del cultivo. En la gráfica a) se representa el crecimiento de la cepa D66 salvaje y la de su mutante para el gen *ybeD*; en la gráfica b) se representa el crecimiento de la cepa SB18101 salvaje y la de su mutante para el gen *ybeD*.

Todas las cepas en estudio sufrieron una reducción en el crecimiento a las 3 horas. A las 6 horas de exposición a CTX, las dos cepas mutantes experimentaron una reducción de crecimiento frente a las cepas salvajes correspondientes, más acentuada en el caso de D66 y su mutante, donde vimos una clara diferencia entre las dos. A las 24 horas, el crecimiento fue similar entre las cepas salvajes y las mutantes.

Estos resultados evidencian un efecto de la ausencia de *ybeD* en el crecimiento de las cepas en presencia de CTX a las 6 horas, lo que sugiere que el gen *ybeD* contribuye a la resistencia frente a CTX durante las primeras etapas del crecimiento. No obstante, su delección no parece influir en el crecimiento bacteriano a más largo plazo (24 horas). El efecto de la delección de *ybeD* fue menos acusado en la cepa SB18101, posiblemente porque su MIC de CTX se encuentra más próxima a la concentración de CTX empleada en este ensayo que la de D66, lo que, en consecuencia, reduce la diferencia de crecimiento entre la cepa SB18101 silvestre y la mutante.

Los datos obtenidos en este ensayo no coinciden con los previamente reportados en una cepa de *E. coli* de referencia modificada experimentalmente para ser CTX-M-1 positiva (Alobaidallah *et al.*, 2023), lo que resalta la importancia de realizar y validar los estudios en cepas clínicas, dado que estas representan con mayor fidelidad la realidad de una infección en un entorno hospitalario.

5. Conclusiones y perspectivas futuras

Las conclusiones de este trabajo son las siguientes:

1. Las cepas salvajes en estudio: D66 (ST58, origen humano) y SB18101 (ST117, origen aviar), presentaron un perfil de resistencias similar. En ambas confirmamos la presencia del gen *bla*_{CTX-M-1} y vimos que mostraron resistencia a la mayoría de las cefalosporinas ensayadas, a las tetraciclinas y sensibilidad al carbapenem. La cepa D66 presentó un perfil de resistencia ampliado respecto a la cepa SB18101, asociado potencialmente a la presencia de una β -lactamasa tipo TEM, ausente en la cepa SB18101, aunque se podría deber a mecanismos no estudiados en este trabajo.

En cuanto al genotipo de virulencia, la batería genética de ambas cepas las vinculó al patotipo APEC, lo que concuerda con el origen de la cepa SB18101 y sugiere el potencial zoonótico de la cepa D66, aislada de sangre humana.

2. El protocolo de mutagénesis Lambda Red, nos permitió conseguir mutantes en ambas cepas, D66 y SB18101, para el gen *ybeD* de *Escherichia coli*: D66 Δ *ybeD* y SB18101 Δ *ybeD*.
3. La reducción en la concentración mínima inhibitoria de cefotaxima en las cepas D66 Δ *ybeD* y SB18101 Δ *ybeD* validó la asociación del gen *ybeD* con la resistencia a cefotaxima, y confirmó su vinculación al resistoma secundario del antibiótico. Sin embargo, la reducción observada en los mutantes fue considerablemente menor que en la cepa de referencia sobre la que se realizaron los estudios previamente publicados.
4. Los resultados del ensayo de cinética de muerte bacteriana (*time kill assay*) muestran que las cepas mutantes lograron recuperar su crecimiento a las 24 horas en presencia de cefotaxima, aunque presentaron una reducción a las 6 horas en comparación con la cepa silvestre, especialmente en el caso de la cepa D66 Δ *ybeD*. Estos hallazgos difieren de lo observado en el estudio previo realizado en una cepa de referencia *Escherichia coli* K12 modificada para ser resistente a CTX.

5. Nuestros resultados sugieren la importancia de realizar estudios de validación en cepas clínicas, replicando con mayor fidelidad condiciones reales a través de bacterias causantes de infecciones y aisladas a partir de estas.

Las perspectivas futuras del trabajo realizado se dividieron en tres puntos principales:

- I. Completar los replicados biológicos del ensayo *time kill assay* con las cepas de estudio para poder demostrar la reproducibilidad y poder establecer conclusiones estadísticas.
- II. Estudiar en mayor profundidad la función del gen *ybeD* en virulencia en *Escherichia coli*, mediante ensayos funcionales como infecciones celulares y estudios de biofilm.
- III. Construir otros mutantes de interés, incluyendo dobles mutantes, de genes identificados en el resistoma secundario de cefotaxima en *Escherichia coli* resistente al antibiótico.
- IV. Estudiar el efecto de la delección del gen *ybeD* en presencia de un tratamiento combinado (por ejemplo, cefotaxima + gentamicina), para analizar el potencial de la proteína YbeD como diana para adyuvantes de dichos tratamientos.

6. Anexos

6.1. Primers utilizados

Estatus ExPEC, APEC, UPEC y ESBL					
Gen diana	Secuencia nucleotídica 5'-3'	Volumen (ml)	Tamaño (pb)	T (°C) annealing	Referencia
<i>bla</i> _{CTX-M} grupo 9	GTGACAAAGAGAGTGCAACGG ATGATTCTCGCCGCTGAAGCC	0.3	856	64	Simarro <i>et al.</i> (2000)
<i>bla</i> _{CTX-M} grupo 1	GGTAAAAAATCACTGCGTC TTGGTGACGATTTTAGCCGC	0.5	863	60	Saladin <i>et al.</i> (2002)
<i>bla</i> _{TEM}	ATGAGTATCAACATTTCCG CTGACAGTTACCAATGCTTA	0.5	868	58	Rasheed <i>et al.</i> (1997)
<i>bla</i> _{SHV}	TTGTCGCTTCTTACTCGCC CCCGGCGATTGCTGATTTCCG	0.3	879	64	Mora <i>et al.</i> (2013)
<i>papC</i>	GTGGCAGTATGAGTAATGACCGTTA ATATCCTTTCTGCAGGGATGCAATA	0.5	205	60	J. R. Johnson <i>et al.</i> (2015)
<i>papEF</i>	ATATCCTTTCTGCAGGGATGCAATA AGAGAGAGCCACTTATACGGACA	0.5	336	62	Yamamoto <i>et al.</i> (1995)
<i>sfa/focDE</i>	CTCCGGAGAACTGGGTGCATCTTAC CGGAGGAGTAATTACAAACCTGGCA	0.5	410	64	Le Bouguenec <i>et al.</i> (1992)
<i>afa/draBC</i>	GCTGGGCAGCAAACCTGATAACTCTC CATCAAGCTGTTTGTTCGTCGCCCG	0.5	750	64	Le Bouguenec <i>et al.</i> (1992)
<i>yfcV</i>	ACATGGAGACCACGTTTACC GTAATCTGGAATGTGGTCAGG	0.5	292	66	Spurbeck <i>et al.</i> (2012)
<i>iutA</i>	GGCTGGACATCATGGGAACCTGG CGTCGGGAACGGGTAGAATCG	0.5	301	64	J. R. Johnson <i>et al.</i> (1997)
<i>iron</i>	AAGTCAAAGCAGGGGTTGCCCG GACGCCGACATTAAGACGCAG	0.3	665	66	J. R. Johnson <i>et al.</i> (2000)
<i>fyuA</i>	GTAACAATCTTCCCGCTCGGCAT TGACGATTAACGAACCGGAAGGGA	0.5	850	66	Spurbeck <i>et al.</i> (2012)
<i>iss</i>	CAGCAACCCGAACCACTTGATG AGCATTGCCAGAGCGGCAGAA	0.3	323	66	T. J. Johnson, Wannemuehler, & Nolan (2008)
<i>ompT</i>	ATCTAGCCGAAGAAGGAGGC CCCGGGTCATAGTGTTTCATC	1	559	60	J. R. Johnson <i>et al.</i> (2015)

<i>kpsM II</i>	GCGATTTGCTGATACTGTTG	0.5	272	64	J. R. Johnson & Stell (2000)
	CATCCAGACGATAAGCATGAGCA				
<i>hlyF</i>	TCGTTTAGGGTGCTTACCTTCAA	0.5	444	60	Morales <i>et al.</i> (2004)
	TTTGCCGGTTTAGGCATTCC				
<i>vat</i>	TCAGGACACGTTTCAGGCATTTCAGT	0.5	1100	66	Spurbeck <i>et al.</i> (2012)
	GGCCAGAACATTTGCTCCCTTGTT				
<i>chuA</i>	ATGGTACCGGACGAACCAAC	0.5	288	58	Clermont <i>et al.</i> (2013)
	TGCCGCCAGTACCAAAGACA				Clermont <i>et al.</i> (2000)

Mutagénesis

Gen diana	Secuencia nucleotídica 5'-3'	Referencia
<i>ybeD</i>	TTCTGGCGGGAGTTGCTATTTAATTACGTTACGCCGGAGCTGACATGAAATGTAGGC	Este trabajo
	TGGAGCTGCTTC	
	GCGAGGAGAGGGGAGTTACCCGACCAGGAGCCGGTAACGGAGAAGCGAGCATA	
	TGAATATCCTCCTTAGTTCCT	

Verificación

Gen diana	Secuencia nucleotídica 5'-3'	Tamaño (pb)	Tamaño mutante (pb)	T _a (°C) annealing	Referencia
<i>ybeD</i>	TCAACTTCCAGCTTGATGGC	744	1953	60	Alobaidallah <i>et al.</i> (2023)
	AATACCGGATAGTGCTCGAC				

7. Referencias

- Alobaidallah, M. S. A., García, V., De Mets, R., Wellner, S. M., Thomsen, L. E., Herrero-Fresno, A., & Olsen, J. E. (2023). Uncovering the Important Genetic Factors for Growth during Cefotaxime-Gentamicin Combination Treatment in *bla*CTX-M-1 Encoding *Escherichia coli*. *Antibiotics*, 12(6). <https://doi.org/10.3390/antibiotics12060993>
- Alobaidallah, M. S. A., García, V., Wellner, S. M., Thomsen, L. E., Herrero-Fresno, A., & Olsen, J. E. (2024). Enhancing the Efficacy of Chloramphenicol Therapy for *Escherichia coli* by Targeting the Secondary Resistome. *Antibiotics*, 13(1). <https://doi.org/10.3390/antibiotics13010073>
- Babic, M., Hujer, A. M., & Bonomo, R. A. (2006). What's new in antibiotic resistance? Focus on beta-lactamases. *Drug Resistance Updates*, 9(3), 142–156. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.drug.2006.05.005>
- Barry, A. L., & Thornsberry, C. (1980). Susceptibility testing: diffusion test procedures. *American Society For Microbiology, Washington, D.C. (USA)*., 463–474.
- Bush, K., & Bradford, P. A. (2016). β -Lactams and β -lactamase inhibitors: an overview. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 6(8), a025247. <https://doi.org/doi.org/10.1101/cshperspect.a025247>
- Che, M., Birk, T., & Hansen, L. T. (2023). Prevalence and Transmission of Extended-Spectrum Cephalosporin (ESC) Resistance Genes in *Escherichia coli* Isolated from Poultry Production Systems and Slaughterhouses in Denmark. *Antibiotics*, 12(11). <https://doi.org/10.3390/antibiotics12111602>
- Clermont, O., Bonacorsi, S., & Bingen, E. (2000). Rapid and Simple Determination of the *Escherichia coli* Phylogenetic Group. *Applied and Environmental Microbiology*, 66(10), 4555–4558. <https://doi.org/10.1128/AEM.66.10.4555-4558.2000>
- Clermont, O., Christenson, J. K., Denamur, E., & Gordon, D. M. (2013). The Clermont *Escherichia coli* phylo-typing method revisited: improvement of specificity and detection of new phylo-groups. *Environmental Microbiology Reports*, 5(1), 58–65. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/1758-2229.12019>
- Clermont, O., Dixit, O. V. A., Vangchhia, B., Condamine, B., Dion, S., Bridier-Nahmias, A., Denamur, E., & Gordon, D. (2019). Characterization and rapid identification of phylogroup G in *Escherichia coli*, a lineage with high virulence and antibiotic

- resistance potential. *Environmental Microbiology*, 21(8), 3107–3117.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1111/1462-2920.14713>
- CLSI. (2025). *2025 Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing, 35th Edition*. <https://www.clsi.org>
- Datsenko, K. A., & Wanner, B. L. (2000). One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 97(12), 6640–6645. <https://doi.org/10.1073/pnas.120163297>
- de Oliveira Silva, Y. R., Contreras-Martel, C., Rodrigues de Melo, R., Zanphorlin, L. M., Trindade, D. M., & Dessen, A. (2025). Architecture of an embracing lipase-foldase complex of the type II secretion system of *Acinetobacter baumannii*. *Structure*. <https://doi.org/10.1016/j.str.2024.12.022>
- De Rosa, M., & Marabotti, A. (2021). Cephalosporins. In S. Offermanns & W. Rosenthal (Eds.), *Encyclopedia of Molecular Pharmacology* (pp. 429–439). Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-030-57401-7_5371
- Doublet, B., Douard, G., Targant, H., Meunier, D., Madec, J.-Y., & Cloeckert, A. (2008). Antibiotic marker modifications of λ Red and FLP helper plasmids, pKD46 and pCP20, for inactivation of chromosomal genes using PCR products in multidrug-resistant strains. *Journal of Microbiological Methods*, 75(2), 359–361. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.mimet.2008.06.010>
- Escherich, T. (1885). Die Darmbakterien des Neugeborenen und Säuglings. *Fortschritte Der Medicin*, 3(16 und 17), 515–554.
- EUCAST. (2025). *Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters version 15.0*. <https://www.eucast.org>.
- European Commission. (2022). *Health Union: HERA delivers list of top-3 health threats to prepare against*. https://ec.europa.eu/commission/presscorner/detail/en/ip_22_4474
- Fratamico, P. M., DebRoy, C., Liu, Y., Needleman, D. S., Baranzoni, G. M., & Feng, P. (2016). Advances in Molecular Serotyping and Subtyping of *Escherichia coli*. *Frontiers in Microbiology*, 7. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00644>
- García, V., Grønnemose, R. B., Torres-Puig, S., Kudirkiene, E., Piantelli, M., Ahmed, S., Andersen, T. E., Møller-Jensen, J., Olsen, J. E., & Herrero-Fresno, A. (2021). Genome-wide analysis of fitness-factors in uropathogenic *Escherichia coli* during

- growth in laboratory media and during urinary tract infections. *Microbial Genomics*, 7(12), 000719. <https://doi.org/10.1099/mgen.0.000719>
- Jana, B., Cain, A. K., Doerrler, W. T., Boinett, C. J., Fookes, M. C., Parkhill, J., & Guardabassi, L. (2017). The secondary resistome of multidrug-resistant *Klebsiella pneumoniae*. *Scientific Reports*, 7(1), 42483. <https://doi.org/10.1038/srep42483>
- Jarlier, V., Nicolas, M.-H., Fournier, G., & Philippon, A. (1988). Extended Broad-Spectrum β -Lactamases Conferring Transferable Resistance to Newer β -Lactam Agents in *Enterobacteriaceae*: Hospital Prevalence and Susceptibility Patterns. *Reviews of Infectious Diseases*, 10(4), 867–878. <https://doi.org/10.1093/clinids/10.4.867>
- Johnson, J. R., Porter, S., Johnston, B., Kuskowski, M. A., Spurbeck, R. R., Mobley, H. L. T., & Williamson, D. A. (2015). Host Characteristics and Bacterial Traits Predict Experimental Virulence for *Escherichia coli* Bloodstream Isolates From Patients With Urosepsis. *Open Forum Infectious Diseases*, 2(3), ofv083. <https://doi.org/10.1093/ofid/ofv083>
- Johnson, J. R., Russo, T. A., Tarr, P. I., Carlino, U., Bilge, S. S., Vary, J. C., & Stell, A. L. (2000). Molecular Epidemiological and Phylogenetic Associations of Two Novel Putative Virulence Genes, *iha* and *iroN* *E. coli*, among *Escherichia coli* Isolates from Patients with Urosepsis. *Infection and Immunity*, 68(5), 3040–3047. <https://doi.org/10.1128/iai.68.5.3040-3047.2000>
- Johnson, J. R., Stapleton, A. E., Russo, T. A., Scheutz, F., Brown, J. J., & Maslow, J. N. (1997). Characteristics and prevalence within serogroup O4 of a J96-like clonal group of uropathogenic *Escherichia coli* O4:H5 containing the class I and class III alleles of *papG*. *Infection and Immunity*, 65(6), 2153–2159. <https://doi.org/10.1128/iai.65.6.2153-2159.1997>
- Johnson, J. R., & Stell, A. L. (2000). Extended Virulence Genotypes of *Escherichia coli* Strains from Patients with Urosepsis in Relation to Phylogeny and Host Compromise. *The Journal of Infectious Diseases*, 181(1), 261–272. <https://doi.org/10.1086/315217>
- Johnson, L. T., Ursula, W., Sara, S., Harry, M., & Maria, S. (2016). *Acinetobacter baumannii* Is Dependent on the Type II Secretion System and Its Substrate LipA for Lipid Utilization and In Vivo Fitness. *Journal of Bacteriology*, 198(4), 711–719. <https://doi.org/10.1128/jb.00622-15>

- Johnson, T. J., Wannemuehler, Y., Doetkott, C., Johnson, S. J., Rosenberger, S. C., & Nolan, L. K. (2008). Identification of Minimal Predictors of Avian Pathogenic *Escherichia coli* Virulence for Use as a Rapid Diagnostic Tool. *Journal of Clinical Microbiology*, *46*(12), 3987–3996. <https://doi.org/10.1128/jcm.00816-08>
- Johnson, T. J., Wannemuehler, Y. M., & Nolan, L. K. (2008). Evolution of the *iss* Gene in *Escherichia coli*. *Applied and Environmental Microbiology*, *74*(8), 2360–2369. <https://doi.org/10.1128/AEM.02634-07>
- Kaper, J. B., Nataro, J. P., & Mobley, H. L. T. (2004). Pathogenic *Escherichia coli*. *Nature Reviews Microbiology*, *2*(2), 123–140. <https://doi.org/10.1038/nrmicro818>
- Kim, S., Kim, Y., & Yoon, S. H. (2019). Overexpression of YbeD in *Escherichia coli*; Enhances Thermotolerance. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, *29*(3), 401–409. <https://doi.org/10.4014/jmb.1901.01036>
- Kozolov, G., Elias, D., Semesi, A., Yee, A., Cygler, M., & Gehring, K. (2004). Structural Similarity of YbeD Protein from *Escherichia coli* to Allosteric Regulatory Domains. *Journal of Bacteriology*, *186*(23), 8083–8088. <https://doi.org/10.1128/jb.186.23.8083-8088.2004>
- Langridge, G. C., Phan, M.-D., Turner, D. J., Perkins, T. T., Parts, L., Haase, J., Charles, I., Maskell, D. J., Peters, S. E., & Dougan, G. (2009). Simultaneous assay of every *Salmonella Typhi* gene using one million transposon mutants. *Genome Research*, *19*(12), 2308–2316.
- Le Bouguenec, C., Archambaud, M., & Labigne, A. (1992). Rapid and specific detection of the *pap*, *afa*, and *sfa* adhesin-encoding operons in uropathogenic *Escherichia coli* strains by polymerase chain reaction. *Journal of Clinical Microbiology*, *30*(5), 1189–1193. <https://doi.org/10.1128/jcm.30.5.1189-1193.1992>
- Loncaric, I., Szostak, M. P., Cabal-Rosel, A., Grünzweil, O. M., Riegelneegg, A., Misic, D., Müller, E., Feßler, A. T., Braun, S. D., Schwarz, S., Monecke, S., Ehricht, R., Ruppitsch, W., Spergser, J., Lewis, A., Bloom, P. H., & Saggese, M. D. (2024). Molecular characterization, virulence and antimicrobial and biocidal susceptibility of selected bacteria isolated from the cloaca of nestling ospreys (*Pandion haliaetus*) from Mono Lake, California, USA. *PLOS ONE*, *19*(9), e0311306-. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0311306>

- Ma, Y., Pirolo, M., Jana, B., Mebus, V. H., & Guardabassi, L. (2024). The intrinsic macrolide resistome of *Escherichia coli*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 68(8), e00452-24. <https://doi.org/10.1128/aac.00452-24>
- MacGowan, A., & Macnaughton, E. (2017). Antibiotic resistance. *Medicine*, 45(10), 622–628. <https://doi.org/10.1016/j.mpmed.2017.07.006>
- Magiorakos, A.-P., Srinivasan, A., Carey, R. B., Carmeli, Y., Falagas, M. E., Giske, C. G., Harbarth, S., Hindler, J. F., Kahlmeter, G., Olsson-Liljequist, B., Paterson, D. L., Rice, L. B., Stelling, J., Struelens, M. J., Vatopoulos, A., Weber, J. T., & Monnet, D. L. (2012). Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. *Clinical Microbiology and Infection*, 18(3), 268–281. <https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2011.03570.x>
- Mainil, J. (2013). *Escherichia coli* virulence factors. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 152(1), 2–12. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.vetimm.2012.09.032>
- Mora, A., Viso, S., López, C., Alonso, M. P., García-Garrote, F., Dabhi, G., Mamani, R., Herrera, A., Marzoa, J., Blanco, M., Blanco, J. E., Moulin-Schouleur, M., Schouler, C., & Blanco, J. (2013). Poultry as reservoir for extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* O45:K1:H7-B2-ST95 in humans. *Veterinary Microbiology*, 167(3), 506–512. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2013.08.007>
- Morales, C., Lee, M. D., Hofacre, C., & Maurer, J. J. (2004). Detection of a Novel Virulence Gene and a *Salmonella* Virulence Homologue Among *Escherichia coli* Isolated from Broiler Chickens. *Foodborne Pathogens and Disease*, 1(3), 160–165. <https://doi.org/10.1089/fpd.2004.1.160>
- Morris, T. W., Reed, K. E., & Cronan, J. E. (1995). Lipic acid metabolism in *Escherichia coli*: the *lplA* and *lipB* genes define redundant pathways for ligation of lipoyl groups to apoprotein. *Journal of Bacteriology*, 177(1), 1–10. <https://doi.org/10.1128/jb.177.1.1-10.1995>
- Murray, C. J. L., Ikuta, K. S., Sharara, F., Swetschinski, L., Robles Aguilar, G., Gray, A., Han, C., Bisignano, C., Rao, P., Wool, E., Johnson, S. C., Browne, A. J., Chipeta, M. G., Fell, F., Hackett, S., Haines-Woodhouse, G., Kashef Hamadani, B. H., Kumaran, E. A. P., McManigal, B., ... Naghavi, M. (2022). Global burden of bacterial antimicrobial resistance in 2019: a systematic analysis. *The Lancet*, 399(10325), 629–655. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(21\)02724-0](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(21)02724-0)

- Navarro, F., Calvo, J., Cantón, R., Fernández-Cuenca, F., & Mirelis, B. (2011). Detección fenotípica de mecanismos de resistencia en microorganismos gramnegativos. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 29(7), 524–534. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.eimc.2011.03.011>
- Nicolas-Chanoine, M.-H., Bertrand, X., & Madec, J.-Y. (2014). *Escherichia coli* ST131, an Intriguing Clonal Group. *Clinical Microbiology Reviews*, 27(3), 543–574. <https://doi.org/10.1128/cmr.00125-13>
- Normark, B. H., & Normark, S. (2002). Evolution and spread of antibiotic resistance. *Journal of Internal Medicine*, 252(2), 91–106. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2796.2002.01026.x>
- Paterson, D. L., & Bonomo, R. A. (2005). Extended-Spectrum β -Lactamases: a Clinical Update. *Clinical Microbiology Reviews*, 18(4), 657–686. <https://doi.org/10.1128/cmr.18.4.657-686.2005>
- Petty, N. K., Ben Zakour, N. L., Stanton-Cook, M., Skipington, E., Totsika, M., Forde, B. M., Phan, M.-D., Gomes Moriel, D., Peters, K. M., Davies, M., Rogers, B. A., Dougan, G., Rodriguez-Baño, J., Pascual, A., Pitout, J. D. D., Upton, M., Paterson, D. L., Walsh, T. R., Schembri, M. A., & Beatson, S. A. (2014). Global dissemination of a multidrug resistant *Escherichia coli* clone. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 111(15), 5694–5699. <https://doi.org/10.1073/pnas.1322678111>
- Piddock, L. J. V. (2016). Reflecting on the final report of the O'Neill Review on Antimicrobial Resistance. *The Lancet Infectious Diseases*, 16(7), 767–768. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(16\)30127-X](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(16)30127-X)
- Ramadan, A. A., Abdelaziz, N. A., Amin, M. A., & Aziz, R. K. (2019). Novel blaCTX-M variants and genotype-phenotype correlations among clinical isolates of extended spectrum beta lactamase-producing *Escherichia coli*. *Scientific Reports*, 9(1), 4224. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-39730-0>
- Rasheed, J. K., Jay, C., Metchock, B., Berkowitz, F., Weigel, L., Crellin, J., Steward, C., Hill, B., Medeiros, A. A., & Tenover, F. C. (1997). Evolution of extended-spectrum beta-lactam resistance (SHV-8) in a strain of *Escherichia coli* during multiple episodes of bacteremia. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 41(3), 647–653. <https://doi.org/10.1128/aac.41.3.647>

- Reid, C. J., Cummins, M. L., Börjesson, S., Brouwer, M. S. M., Hasman, H., Hammerum, A. M., Roer, L., Hess, S., Berendonk, T., Nešporová, K., Haenni, M., Madec, J.-Y., Bethe, A., Michael, G. B., Schink, A.-K., Schwarz, S., Dolejska, M., & Djordjevic, S. P. (2022). A role for ColV plasmids in the evolution of pathogenic *Escherichia coli* ST58. *Nature Communications*, *13*(1), 683. <https://doi.org/10.1038/s41467-022-28342-4>
- Saidenberg, A. B. S., Edslev, S. M., Hallstrøm, S., Rasmussen, A., Park, D. E., Aziz, M., B, dos S. Q., Baptista, A. A. S., Barbosa, F., Rocha, V. G. P., M, van V. A. H., Dalsgaard, A., Price, L. B., Knöbl, T., & Stegger, M. (2024). *Escherichia coli* ST117: exploring the zoonotic hypothesis. *Microbiology Spectrum*, *12*(10), e00466-24. <https://doi.org/10.1128/spectrum.00466-24>
- Saladin, M., Cao, V. T. B., Lambert, T., Donay, J.-L., Herrmann, J.-L., Ould-Hocine, Z., Verdet, C., Delisle, F., Philippon, A., & Arlet, G. (2002). Diversity of CTX-M β -lactamases and their promoter regions from *Enterobacteriaceae* isolated in three Parisian hospitals. *FEMS Microbiology Letters*, *209*(2), 161–168. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2002.tb11126.x>
- Simarro, E., Navarro, F., Ruiz, J., Miró, E., Gómez, J., & Mirelis, B. (2000). *Salmonella enterica* Serovar Virchow with CTX-M-Like β -Lactamase in Spain. *Journal of Clinical Microbiology*, *38*(12), 4676–4678. <https://doi.org/10.1128/jcm.38.12.4676-4678.2000>
- Spurbeck, R. R., Dinh, P. C., Walk, S. T., Stapleton, A. E., Hooton, T. M., Nolan, L. K., Kim, K. S., Johnson, J. R., & Mobley, H. L. T. (2012). *Escherichia coli* Isolates That Carry *vat*, *fyuA*, *chuA*, and *yfcV* Efficiently Colonize the Urinary Tract. *Infection and Immunity*, *80*(12), 4115–4122. <https://doi.org/10.1128/iai.00752-12>
- Upmanyu, N., & Malviya, V. N. (2020). 18 - Antibiotics: mechanisms of action and modern challenges. In P. Chowdhary, A. Raj, D. Verma, & Y. Akhter (Eds.), *Microorganisms for Sustainable Environment and Health* (pp. 367–382). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-819001-2.00018-8>
- Ventola, C. L. (2015). The antibiotic resistance crisis: part 1: causes and threats. *Pharmacy and Therapeutics*, *40*(4), 277.
- Vila, J., Sáez-López, E., Johnson, J. R., Römling, U., Dobrindt, U., Cantón, R., Giske, C. G., Naas, T., Carattoli, A., Martínez-Medina, M., Bosch, J., Retamar, P., Rodríguez-Baño, J., Baquero, F., & Soto, S. M. (2016). *Escherichia coli*: an old friend with new

- tidings. *FEMS Microbiology Reviews*, 40(4), 437–463.
<https://doi.org/10.1093/femsre/fuw005>
- Wellner, S. M., Alobaidallah, M. S. A., Fei, X., Herrero-Fresno, A., & Olsen, J. E. (2024). Genome-wide identification of fitness-genes in aminoglycoside-resistant *Escherichia coli* during antibiotic stress. *Scientific Reports*, 14(1), 4163.
<https://doi.org/10.1038/s41598-024-54169-8>
- Wirth, T., Falush, D., Lan, R., Colles, F., Mensa, P., Wieler, L. H., Karch, H., Reeves, P. R., Maiden, M. C. J., Ochman, H., & Achtman, M. (2006). Sex and virulence in *Escherichia coli*: an evolutionary perspective. *Molecular Microbiology*, 60(5), 1136–1151. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2006.05172.x>
- World Health Organization. (2024). *WHO bacterial priority pathogens list, 2024: bacterial pathogens of public health importance, to guide research, development, and strategies to prevent and control antimicrobial resistance*. World Health Organization.
- Wright, G. D. (2007). The antibiotic resistome: the nexus of chemical and genetic diversity. *Nature Reviews Microbiology*, 5(3), 175–186.
<https://doi.org/10.1038/nrmicro1614>
- Xia, F., Jiang, M., Wen, Z., Wang, Z., Wang, M., Xu, Y., Zhuge, X., & Dai, J. (2022). Complete genomic analysis of ST117 lineage extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* (ExPEC) to reveal multiple genetic determinants to drive its global transmission: ST117 *E. coli* as an emerging multidrug-resistant foodborne ExPEC with zoonotic potential. *Transboundary and Emerging Diseases*, 69(6), 3256–3273.
<https://doi.org/10.1111/tbed.14678>
- Yamamoto, S., Terai, A., Yuri, K., Kurazono, H., Takeda, Y., & Yoshida, O. (1995). Detection of urovirulence factors in *Escherichia coli* by multiplex polymerase chain reaction. *FEMS Immunology & Medical Microbiology*, 12(2), 85–90.
<https://doi.org/10.1111/j.1574-695X.1995.tb00179.x>